

dc\_228\_11

**AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Biológiailag aktív oligoszacharidok és  
analogonjaik szintézise**

**Dr. Borbás Anikó**

Debreceni Egyetem  
Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Gyógyszerészi Kémia Tanszék,  
MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport

2012

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>5</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Az oligoszacharidok biológiai szerepe és kémiai szintézisük jelentősége</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Védőcsoportok szerepe az oligoszacharidok kémiai szintézisében</b>	<b>8</b>
2.2.1. Éter védőcsoportok	8
2.2.2. Észter védőcsoportok	10
2.2.3. Acetál védőcsoportok	11
2.2.4. Egyéb védőcsoportok	12
2.2.5. A védőcsoportok megválasztásának sajátos szempontjai	13
<b>2.3. A glikozidos kötés térállása</b>	<b>14</b>
<b>2.4. Glikozil donorok, glikozilezési módszerek</b>	<b>18</b>
<b>3. Növényi arabinogalaktán oligoszacharidok szintézise</b>	<b>23</b>
<b>3.1. A növényi sejtfal arabinogalaktánok felépítése és biológiai szerepe</b>	<b>23</b>
<b>3.2. A növényi sejtfal-poliszacharidok szerkezetének meghatározása</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Növényi arabinogalaktán-oligoszacharidok szintézise – irodalmi áttekintés</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Arabinogalaktán oligoszacharid-sorozat moduláris szintézise - Saját eredmények<sup>78-81</sup></b>	<b>33</b>
3.4.1. Ciklikus izopropilidén-acetál és MIP vegyes acetál védőcsoportkombináción alapuló szintézisterv kidolgozása <sup>78</sup>	33
3.4.2. Különböző hosszúságú galaktán modulok szintézise <sup>79-81</sup>	37
3.4.3. Változatos szerkezetű, mono- és diarabinozilezett arabinogalaktánok szintézise	38
3.4.4. Az arabinogalaktánok biológiai vizsgálata. A vegyes acetál védőcsoport hasznosítása ciklodextrineken	43
<b>4. Sziálsav-tartalmú lektin ligandumok szulfonsav mimetikumainak szintézise</b>	<b>45</b>
<b>4.1. A szelektív lektinek és a szialil Lewis X szerepe a gyulladásos folyamatokban</b>	<b>45</b>
<b>4.2. A szialil Lewis X hatás-szerkezet összefüggéseinek felderítése</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Szialil Lewis X mimetikumok szintézise - irodalmi áttekintés</b>	<b>49</b>
4.3.1. Az <i>N</i> -acetilneuraminsav rész helyettesítése	50
4.3.2. A sziálsav és az <i>N</i> -acetilglükózamin rész helyettesítése	51
4.3.3. Egyetlen cukoregységet tartalmazó mimetikumok	52
4.3.4. Újabb funkciós csoportok bevitele	55
4.3.5. Glikoklaszterek, multivalens származékok	55
<b>4.4. Új típusú lektin-ligandumok szintézise - Saját eredmények<sup>127-134</sup></b>	<b>57</b>
4.4.1. Potenciális szelektin-anatagonisták előállítás 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil építőelem felhasználásával	57
4.4.2. A proton-szén három kötéson át ható csatolási állandók szerepe ketozil-glikozidok szerkezetvizsgálatában <sup>130</sup>	66
4.4.3. Az <i>N</i> -acetil neuraminsav szulfonsav mimetikumának szintézise L-fukózból <sup>133</sup>	70
4.4.4. A <i>Helicobacter pylori</i> fertőzés gyógyításában felhasználható anionos szénhidrátok szintézise <sup>129</sup>	73
<b>5. Véralvadásgátló hatású heparinoid pentaszacharid-szulfonsavak szintézise</b>	<b>78</b>

<b>5.1. A heparin szerkezete és biológiai szerepe</b>	<b>78</b>
<b>5.2. A heparin véralkodásgátló hatásának mechanizmusa. Az első szintetikus heparionoid gyógyszer kifejlesztése</b>	<b>81</b>
<b>5.3. Újabb, egyszerűbb szerkezetű szintetikus antitrombotikumok kutatása, az idraparinux szintézise</b>	<b>83</b>
<b>5.4. Az idraparinux bioizoszter szulfonsav-mimetikumainak szintézise – Saját eredmények<sup>170-176</sup></b>	<b>88</b>
5.4.1. Az EF és GH diszacharid-fragmensek szulfonsav-mimetikumainak szintézise	89
5.4.2. A DEF triszacharid-fragmens szulfonsav mimetikumainak szintézise	95
5.4.3. Az idraparinux első szulfonsav mimetikumának szintézise <sup>174-176</sup>	98
5.4.4. Az idraparinux triszulfonsav mimetikumának szintézise <sup>175-176</sup>	102
5.4.5. A pentaszacharid-szulfonsavak véralkodásgátló hatásának vizsgálata	106
<b>6. Összefoglalás</b>	<b>109</b>
<b>7. Irodalomjegyzék</b>	<b>111</b>
<b>8. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>124</b>

## 1. Bevezetés

Akadémiai doktori értekezésemben a PhD fokozatszerzés után végzett kutatásaim legfontosabb eredményeit mutatom be. A kutatómunkát az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportnál végeztem, ami 1996-ban alakult Lipták András vezetésével a Debreceni Egyetem (akkor Kossuth Lajos Tudományegyetem) Biokémiai Tanszékén, majd 2005-ben Antus Sándor irányítása alatt a Szerves Kémiai Tanszékhez csatlakozott.<sup>1,2</sup>

A dolgozat tárgya oligoszacharidok kémiai szintézise. Ma már közzismert tény, hogy a sejtek felületén glikoproteinek vagy glikolipidek formájában megjelenő oligoszacharidok számos alapvető biológiai folyamatban kulcsszerepet játszanak mint információhordozók.<sup>3,4</sup> A szénhidrátok részvételével zajló bonyolult biokémiai folyamatok felderítéséhez nélkülözhetetlenek a szintetikusan előállított természetes és módosított oligoszacharidok, ezért a szintetikus oligoszacharidkémia a szénhidrátkémia rendkívül fontos és dinamikusan fejlődő területe.

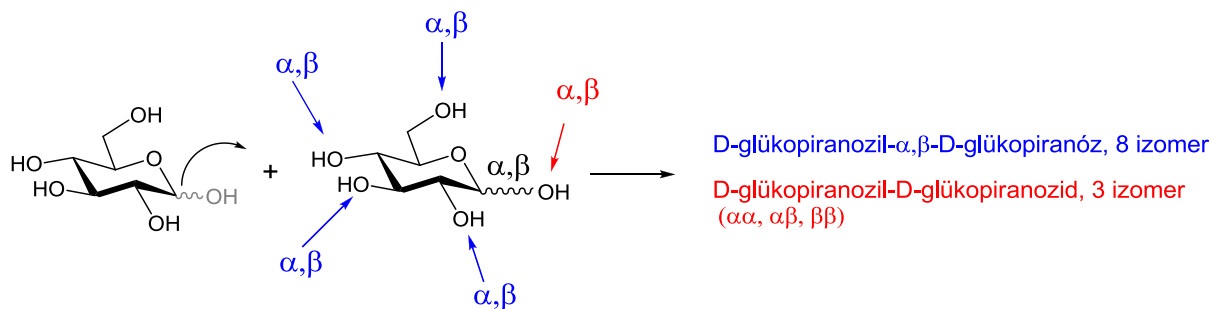
Egyetemi hallgatóként csatlakoztam a Lipták András vezette szénhidrátkémiai iskolához, ahol abban az időben elsősorban az acetál védőcsoportok vizsgálatával, valamint bakteriális oligoszacharidok kémiai szintézisével foglalkoztak. Ebben a témakörben szereztem PhD fokozatot Lipták András témavezetésével. Ezt követően is folytattam a szénhidrátok acetáljainak szintézisére és regioszelektív átalakítására, valamint természetes oligoszacharidok előállítására irányuló munkát. Emellett az anionos szénhidrátok szulfonsav mimetikumainak szintézisével is foglalkozni kezdtem, amit növekvő érdeklődéssel és intenzitással folytatok.

A glikozilezési módszerekről és az oligoszacharidok szintézisekor alkalmazott stratégiákról,<sup>5-18</sup> valamint a védőcsoportok szelektív kialakításáról és eltávolításáról<sup>19-24</sup> számos összefoglaló mű született. Ennek ellenére, az oligoszacharidkémiaiban kevésbé otthonos olvasó számára a dolgozat elején nagyon röviden áttekintem a terület irodalmát. Ezután saját kutatásainkat mutatom be három fejezetben. Az első részben növényi eredetű elágazó láncú arabinogalaktánok előállítását ismertetem; a második és a harmadik részben a különböző biológiai szabályozási folyamatokban meghatározó szerepet játszó negatív töltésű szénhidrátok (pl. szialil Lewis X, heparin) szulfonsav mimetikumainak előállításáról írok. A fejezetek hármastagolásúak, először tárgyalom az adott terület biológiai hátterét, ezt követően ismertetem a közvetlen szintetikus előzményeket, végül saját kutatásainkat mutatom be. A dolgozat kísérleti részt nem tartalmaz, mivel a bemutatott eredmények kísérletes közlemények és doktori értekezések formájában már publikálásra kerültek.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Az oligoszacharidok biológiai szerepe és kémiai szintézisük jelentősége

A szénhidrátok a legnagyobb változatosságot mutató biomolekulák. A változatosság elsődleges forrása az, hogy a polifunkciós építőelemek összekapcsolódása glikozidos kötéssel nagyon sokféleképpen valósulhat meg: a donor molekula glikozidos szénatomja az akceptor bármelyik hidroxiljával összekapcsolódhat, ami regioizomereket eredményez, ráadásul a kötés a glikozidos centrumhoz  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -oldalról is csatlakozhat, így minden regioizomer kétféle (a glikozidos centrumok összekapcsolódásánál háromféle) sztereoizomer formában keletkezhet (1. ábra).



1. ábra. Glükopiranoz molekulák összekapcsolódása diszachariddá

Tovább növeli a változatosságot a monoszacharid építőelemek nagy száma; a különböző monoszacharidok elsősorban az alkoholos hidroxilcsoportok térállásában különböznek, de tartalmazhatnak a hidroxilon kívül egyéb funkciós csoportokat is (aminocsoport, karboxilcsoport). Újabb szerkezeteket eredményez az, hogy egy adott cukor különböző gyűrűméretekben (piranoz, furanoz forma) és nyílt láncú formában is előfordulhat. Az 1. táblázat bemutatja, hogy azonos számú monomerből elvileg hányféle oligopeptid és oligoszacharid izomer építhető fel.<sup>4</sup> (Az oligoszacharid-izomerek száma csak a piranozgyűrűs formákon alapul.)

	Összetétel	Peptid	oligoszacharid (csak piranóz forma)
Dimer	AA	1	11
Trimer	AAA	1	120
Tetramer	AAAA	1	1424
Pentamer	AAAAA	1	17872
Dimer	AB	2	20
Trimer	ABC	6	720
Tetramer	ABCD	24	34560
pentamer	ABCDE	120	2144640

1. táblázat. Oligopeptid- és oligoszacharid-izomerek lehetséges száma

Ez a rendkívül nagy variációs képesség teszi alkalmassá a szénhidrátokat arra, hogy a biológiai felismerési és szabályozási folyamatok sokoldalú és meghatározó szereplői legyenek.<sup>3,4,25,26</sup> Ma már közismert tény, hogy a sejtfelszíni glikopeptidek és glikolipidek kulcsszerepet játszanak a biológiai jelek továbbításában, a sejt-sejt felismerési folyamatokban és különböző betegségek kialakulásában, ám a szénhidrátok szerkezete és funkciója közötti összefüggésről nagyon keveset tudunk. A sejtfelszíni oligoszacharidok és glikokonjugátumok részletes biofizikai és biokémiai tanulmányozásán alapuló, gyorsan fejlődő tudományterület, a molekuláris glikobiológia igyekszik ezen összefüggéseket feltárni. A vizsgálatokhoz nagy tisztaságú és pontosan ismert szerkezetű szénhidrátok szükségesek, amelyek megfelelő mennyiségben általában csak szintetikus úton állíthatók elő, mivel természetes formában gyakran kis koncentrációban és mikroheterogén formában vannak jelen.

A glikobiológia igénye alapján a szénhidrátkémikusok egyik fontos feladata természetes szénhidrátok előállítása kémiai, enzimatis és kemoenzimatis módszerekkel. Van azonban egy másik, legalább ilyen fontos feladatuk is: megfelelően módosított, „nem-természetes” szénhidrátok szintézise. A természetes szénhidrátok módosított mimetikumai segítenek a hatás-szerkezet összefüggések feltárásában, a biológiai szerephez nélkülözhetetlen farmakofór csoportok meghatározásában, és gyógyszerjelöltként is szerepelhetnek.

Ha modern terminológiát szeretnénk használni, akkor a megfogalmazott feladatokat a kémiai biológia tárgykörébe kell sorolnunk. A kémiai biológia a kémiai ismeretek, módszerek, eszközök felhasználásával akarja megismerni és esetenként befolyásolni a biológiai folyamatokat. Az bizonyos, hogy akár a szerves kémia, akár a kémiai biológia részének tekintjük, a szintetikus oligoszacharidkémia legfontosabb feladata hogy vegyületek sokasága formájában megfelelő mennyiségű kémiai anyagot szolgáltatson az élő folyamatok megértéséhez és jobbító megváltoztatásához.

## **2.2. Védőcsoportok szerepe az oligoszacharidok kémiai szintézisében**

A monoszacharidok több, nagyon hasonló reaktivitású hidroxilcsoportja miatt az oligoszacharidok kémiai szintézise sokkal nehezebb feladat, mint a peptideké vagy a nukleinsavaké. A szintézis során a legnagyobb kihívást az jelenti, hogy valamennyi monoszacharid építőelem valamennyi hidroxilcsoportján átalakításokat kell végezni, még hozzá szelektív módon. A glikozilezési reakciókban aktiválni kell a donor (glikozilező cukoregység) anomer centrumát és védeni valamennyi hidroxilcsoportját; szintén védőcsoportokkal kell ellátni az akceptor (glikozilezendő cukoregység) hidroxiljait, szabadon hagyva, vagy szelektíven felszabadítható formában védve a glikozilezési helyet. A védőcsoportokat olyan módon kell megválasztani, hogy elősegítsék a kívánt glikozidos kötés sztereoszelektív kialakulását.

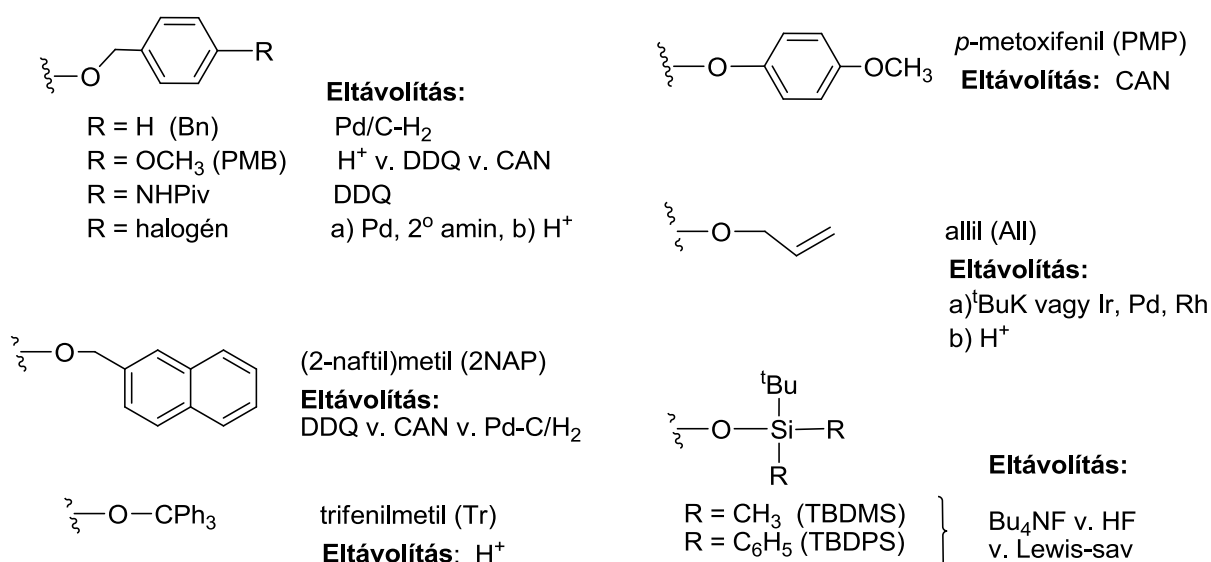
A rendelkezésre álló védőcsoportok rendkívül nagy választéka lehetővé teszi minden egyes hidroxil megfelelő, egyedi védelmét, ami alapvető fontosságú a sikeres szintézishez. Leggyakrabban éter, acetál vagy észter csoportokkal védjük a hidroxilokat, esetenként használunk ortoésztereket, és karbonátokat is. A védőcsoportokat az adott szintézisben betöltött szerepük szerint állandó vagy időleges csoportokra oszthatjuk. Állandó védőcsoportokkal azokat a pozíciókat látjuk el, ahol a végtermék szabad hidroxilt tartalmaz, így azokat a szintézis utolsó lépésében távolítjuk el. Időleges védőcsoportokkal védjük azokat a hidroxilokat, amelyeket a szintézis egy adott fázisában fel kell szabadítanunk, valamilyen átalakítás, pl. lánchosszabbítás, lánצלágazás vagy funkciós csoport kialakítása céljából.

### **2.2.1. Éter védőcsoportok**

A szénhidrátkémiában általánosan elterjedt éterek (2. ábra) az arilmetil-, allil- és szililcsoportok. Állandó védőcsoportként leggyakrabban benzilt használunk, ami stabil a védőcsoport-átalakítások és glikozilezések körülményei között, ugyanakkor katalitikus

hidrogénezéssel könnyen eltávolítható. Időleges védőcsoportként szerepelhetnek a szubsztituált benzil-éterek, amelyek a benzil mellől szelektíven eltávolíthatók savas hidrolízissel - mint a *p*-metoxibenzil (PMB) és a trifenilmetil (tritol)<sup>27</sup> -, vagy egyelektron-transzfer mechanizmusú oxidációval – mint a (2-naftil)metil<sup>28</sup> (NAP) vagy a PMB.<sup>29</sup> Szintén oxidatív úton távolítható el az ariléter típusú *p*-metoxifenil (PMP) csoport.<sup>30</sup> A halogénezett benzil-éterek közvetlenül nem hasíthatók, aminobenzil-csoporttá történő átalakítás után viszont már savakkal hidrolizálhatók akár *p*-metoxibenzil- és szilil-éterek mellől is.<sup>31</sup> A stabil allil-éter is használható időleges védelemre, mivel izomerizációval labilis enoléterré alakítható.<sup>32</sup> Eltávolítása két lépésben történik: a kettős kötés izomerizációja az első lépés, amit erős bázissal vagy nemesfém katalizátorokkal idézhetünk elő, ezt követi a képződött enoléter savas hidrolízise.

A rendkívül nagy számban létező szilil-éterek nagyon jól használható időleges védőcsoportok, mivel stabilitásuk a szilil-atom szubsztituenseinek méretével finoman hangolható: minél nagyobbak a szubsztituensek, annál stabilabb az éter. Hátrányos tulajdonságuk, hogy bázikus közegben vándorolnak. Oligoszacharidok szintézisében a *tert*-butil-dimetilszilil (TBDMS) és a *tert*-butil-difenilszilil (TBDPS) csoportot használják leggyakrabban, ez utóbbi nagy térkitöltése miatt alkalmas primer hidroxilok szelektív védelmére is. Specifikus eltávolításuk fluorid reagensekkel történik, de különböző Lewis-savakkal is könnyen hasíthatók.



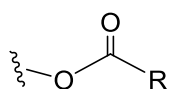
2. ábra. Éter védőcsoportok és leggyakoribb eltávolítási módjuk



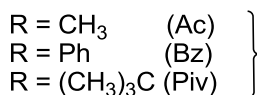
### 2.2.2. Észter védőcsoportok

Kiválóan alkalmazhatók átmeneti védőcsoportként az észterek (3. ábra), de használatuknál szem előtt kell tartani, hogy bázikus körülmények között vándorolnak. Tipikus hasítási módjuk a Zemplén-féle dezacilezés (katalitikus NaOMe metanolban); ezzel a kíméletes átészterezési reakcióval szinte valamennyi éter és acetál védőcsoport mellől szelektíven eltávolíthatók. Savasan is elvégezhetjük az észterhasítást acetilkloridból *in situ* generált sósavval, így a savérzékenyebb acetyl szelektíven eltávolítható a benzoil mellől anélkül, hogy a terméken acilvándorlás történne. A szterikusan gátolt pivaloát (Piv, neopentánsav-észter) jóval stabilabb, mint az acetyl, és kevésbé hajlamos vándorlásra, további előnye, hogy alkalmas primer hidroxil szelektív védelmére. A klórozott acetilek (pl. monoklóracetyl, MCA) eltávolítására specifikusan alkalmazható a tiokarbamid hasítás. A levulinsav-észter (Lev, 4-oxopentánsav-észter) egyre népszerűbb az oligoszacharidok szintézisében, mivel hidrazin-acetáttal még monoklóracetyl mellől is szelektíven hasítható, ugyanakkor savas körülmények között nagyon stabil. Nemrégiben közölt szubsztituált acetyl védőcsoport a (2-nitrofenil)acetyl (NPAC), ami specifikusan hasítható metanolban Zn-NH<sub>4</sub>Cl reagenssel, így szelektíven eltávolítható acetilek és egyéb bázisérzékeny csoportok, többek között Fmoc (9-fluorenilmetoxikarbonil) és levulinoil csoport mellől is.<sup>33</sup>

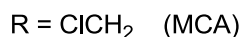
Nagyméretű, egyszerűbb szerkezetű oligoszacharidok szintézise megvalósítható kizárólag észter védőcsoportok alkalmazásával. Ekkor általában benzoát formájában maszkírozzák a végtermékben szabad hidroxilokat, időleges védőcsoportként pedig acetyl és monoklóracetyl csoportokat alkalmaznak.



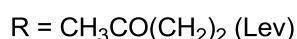
#### Eltávolítás:



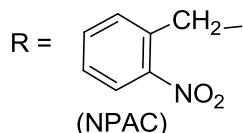
NaOMe



NaOMe vagy tiokarbamid vagy NaHCO<sub>3</sub>



NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH



Zn, NH<sub>4</sub>Cl / MeOH

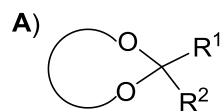
3. ábra. Észter védőcsoportok és leggyakoribb eltávolítási módjuk

### 2.2.3. Acetál védőcsoportok

A szénhidrátkémiában nagyon kedveltek a ciklikus acetál védőcsoportok (4. ábra), mivel egy lépésben egyszerre két hidroxilcsoportot védhetünk velük. Az acetálok bázikus közegben stabilak, savas hidrolízissel könnyen eltávolíthatók. A hexopiranozidok 4-es és 6-os hidroxiljából hagyományos acetálózó reagensekkel (benzaldehyddel, acetonnal vagy ezek dimetil-acetál származékaival) könnyen képződnek hattagú, 1,3-dioxán típusú ciklikus acetálok. A vicinális *cisz*-diolok ugyanilyen reagensekkel készségesen képeznek öttagú, 1,3-dioxolán típusú acetálokat.<sup>21</sup> A vicinális *transz* helyzetű hidroxilokból öttagú-gyűrűs acetálokat képezni a gyűrűfeszültség miatt nehéz, ezért védelmükre különleges, két acetálos centrumot tartalmazó hattagú-gyűrűs védőcsoportokat fejlesztettek ki, közülük leggyakoribb a bután-1,2-dimetilacetál (BDA) és a ciklohexán-1,2-dimetilacetál (CDA).<sup>22,23</sup>

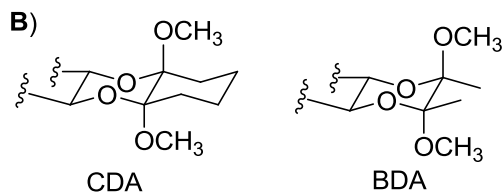
Diolok egyidejű védelmére szilil-acetálok is alkalmazhatók, kialakításuk a szililéterképzéshez hasonlóan halogenid reagenssel történik, bázikus körülmények között. Legismertebb képviselőjük a tetraizopropil-disziloxán-acetál (TIPDS).<sup>22</sup>

A benzilidén típusú acetálok különleges előnye, hogy esetükben a két védett hidroxil közül az egyik regioszelektív módon felszabadítható akár oxidatív, akár redukzív körülmények között, miközben a másik hidroxil védve marad észter, vagy éter csoporttal. Oligoszacharidok szintézisében általában a redukzív gyűrűnyitást alkalmazzák, amelyet Lewis vagy protikus savval kombinált hidrid-donor reagenssel hajtanak végre.<sup>23</sup>



dioxán acetálok: 4,6-diolok védelme  
dioxolán acetálok: vicinális *cisz*-diolok védelme

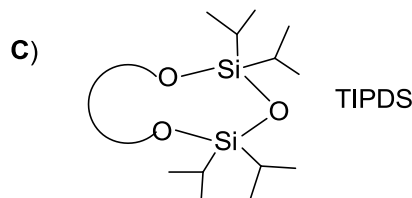
1.  $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$  (izopropilidén)
2.  $R^1 = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R^2 = \text{H}$  (benzilidén)
3.  $R^1 = \text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$ ,  $R^2 = \text{H}$  (*p*-metoxibenzilidén)
4.  $R^1 = R^2 = \text{C}_6\text{H}_5$  (difenilmetilén)
5.  $R^1 = \text{NAP}$ ,  $R^2 = \text{H}$  (2-naftilmetilén)



CDA

BDA

vicinális *transz*-diolok védelme



TIPDS

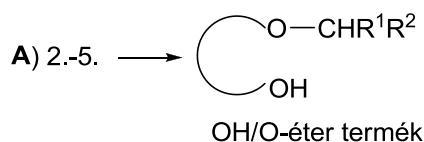
(1,1,3,3-tetraizopropil-disziloxánilidén)

**Eltávolítás** (diol regenerálása):

**A)** és **B)** típus:  $\text{H}^+$ ; **C)** típus:  $\text{F}^-$  ( $\text{Bu}_4\text{NF}$ )

**Benzilidén-típusú ciklikus acetálok átalakítása**  
**parciális hidrogenolízissel:**

egyik OH regenerálása és éterképződés:  
hidrid-donor reagens + protikus vagy Lewis-sav



OH/O-éter termék

4. ábra. Ciklikus acetál védőcsoportok szerkezete, eltávolítása, és a benzilidén-típusú acetálok hidrogenolitikus átalakításának sémája

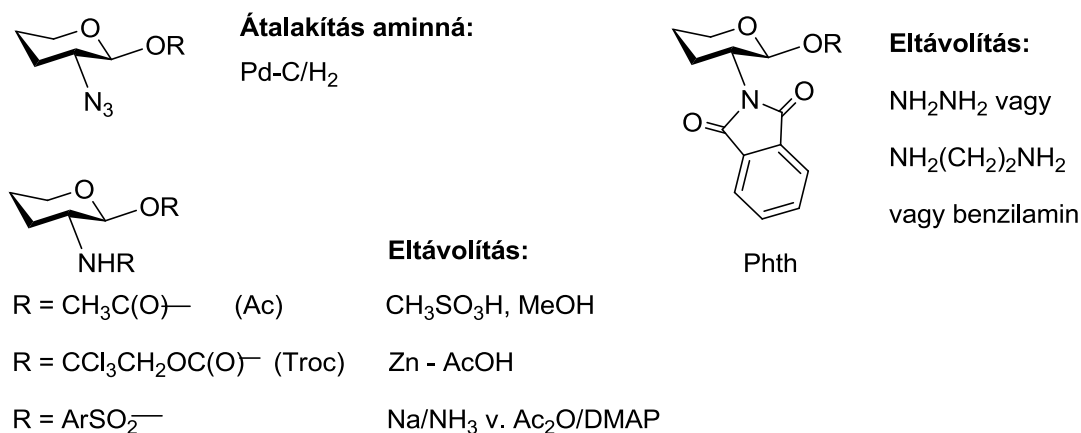
## 2.2.4. Egyéb védőcsoportok

Vicinális diolok védelmére jól használható speciális csoportok az ortoészterek. Az axiális/ekvatoriális diolon kialakított ortoészterek savas körülmények között (trifluorecetsav acetonnitrilben) regioszelektíven az ekvatoriális-OH/axiális-észter típusú származékot adják.<sup>22</sup>

A karbonátok közül a szilárdfázisú szintézisekben jól bevált a (9-fluorenil)metoxikarbonil (Fmoc) csoport, mivel eltávolítása könnyű ( $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) és jól detektálható. Két hidroxil egyidejű védelmére ciklikus karbonátokat is alkalmaznak, amelyek *cisz*- és *transz*-diolokon is könnyen kialakíthatók.

A szénhidrátok a hidroxilokon, és oxocsoporton kívül karboxil és amino funkciós csoportokat is tartalmazhatnak. A karboxilcsoportot általában észter (metil, *terc*-butil vagy benzil) formájában védik. A metilcsoportot enyhe lúgos hidrolízissel, a *terc*-butil-csoportot savas hidrolízissel, a benzilt pedig katalitikus hidrogenolízissel hasíthatjuk le a karboxilcsoportról.

Az aminocsoportok maszkírozására vagy védelmére az azid, karbamát (*N*-triklóretoxikarbonil, Troc) és imid (*N*-ftaloil, Phth) forma a legelterjedtebb. (5. ábra)



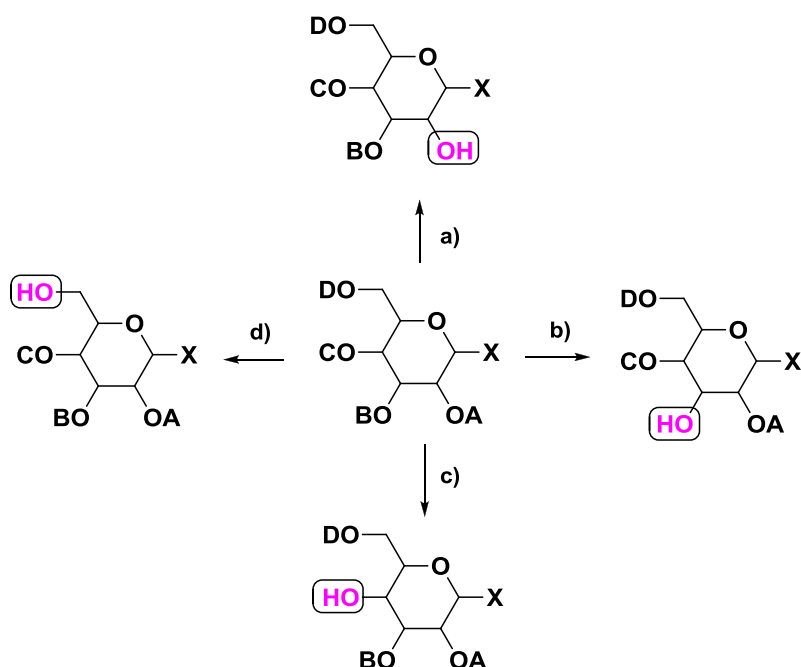
5. ábra. Amino védőcsoportok és leggyakoribb eltávolítási módjuk

### 2.2.5. A védőcsoportok megválasztásának sajátos szempontjai

Az oligoszacharidkémiaiban a védőcsoportok megválasztásánál azt is figyelembe kell venni, hogy az adott csoportok hogyan befolyásolják a glikozilezési reakcióban a donor reaktivitását vagy a kialakuló glikozidos kötés térállását. Reaktivitás szempontjából a védőcsoportok lehetnek aktiváló és dezaktiváló hatásúak, szterikus irányítás szempontjából pedig lehetnek résztvevő és nemrésztvevő jellegűek. Mindkét hatás elsősorban a glikozidos centrum szomszédságában lévő szubsztituensnél jelentkezik. Az elektronküldő szubsztituensek aktiváló, az elektronszívóak dezaktiváló hatásúak; az észter típusú csoportok résztvevő, az éterek nemrésztvevő jellegűek. Ugyanakkor a távolabbi szubsztituensek szerepe sem hanyagolható el, hiszen például a donor valamennyi szubsztituense hatással van a belőle képződő karbéniumion stabilitására és konformációjára, és ezáltal a glikozilezés sztereokémiai kimenetelére. Nagyon fontosak a szterikus hatások is: a donor és akceptor valamennyi szubsztituense befolyásolja glikozilezéskor a reakciópartnerek térbeli illeszkedését.

Az oligoszacharidok szintézisét tárgyaló közleményekben gyakran találkozhatunk az ortogonális védőcsoportok, illetve az ortogonális védőcsoportkészlet kifejezésekkel.<sup>34-36</sup> Adott **A**, **B**, **C** és **D** védőcsoportnál az ortogonalitás (merőlegesség) azt jelenti, hogy a csoportok tetszőleges sorrendben, szelektíven eltávolíthatók egymás mellől: **a**) körülmények között csak az **A** csoport, **b**) körülmények között csak a **B** csoport hasad le, és így tovább (6. ábra). Önmagában tehát egy csoport nem lehet ortogonális, az ortogonalitás csak más csoportokhoz viszonyítva értelmezhető. Ortogonális hidroxil-védőcsoportok például a bázikusan hasítható észterek és a savasan hasítható acetálok, amelyek egymás mellől szelektíven eltávolíthatók. Egy adott hasítási csoporton belül is lehetséges további szelektív eltávolítás; a klóracetil, vagy a (2-nitrofenil)acetil (NPAC) szelektíven eltávolítható egyéb észtercsoportok (pl. acetyl)

mellől, mivel mindkettőnek létezik specifikus hasítási módja, az előbbi tiokarbamiddal az utóbbi  $\text{Zn-NH}_4\text{Cl}$ /metanol reagenssel távolítható el.



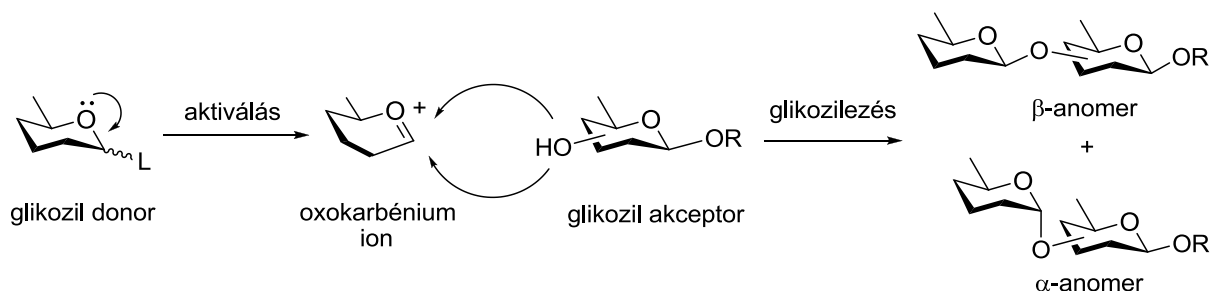
6. ábra. Ortogonálisan védett monoszacharid átalakítása

Az ortogonális védőcsoportkészletek alkalmazásával a heterogén szerkezetű poliszacharidok alkotóelemeinek szintézise sokkal hatékonyabbá tehető. A rendkívül változatos szulfatáltsági fokú heparin és heparán szulfát esetében egyetlen ortogonálisan védett diszacharidból az összes szulfatációs változat előállítható.<sup>30,35</sup> Az automatizált oligoszacharid-szintézisben<sup>17,18</sup> szintén óriási jelentősége van az ortogonális csoportoknak, hiszen néhány ortogonálisan védett építőelem felhasználásával viszonylag könnyen lehet oligoszacharid-könyvtárakat létrehozni.<sup>36</sup>

### 2.3. A glikozidos kötés térállása

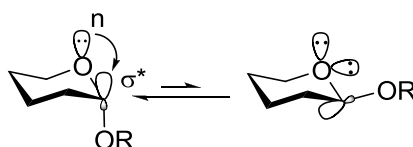
Az oligoszacharid-szintézisek glikozilezési lépésében az egyik szénhidrátmolekula (donor) glikozidos szénatomja és a másik szénhidrátmolekula (akceptor) valamelyik alkoholos hidroxilcsoportja között alakítunk ki kötést, általában nukleofil szubsztitúciós ( $S_N$ ) reakcióban. Minden glikozidképzésnél kétféle sztereoizomer képződhet:  $\alpha$ - és  $\beta$ -anomer, és a megfelelő anomer szelektív előállítása az oligoszacharidkémia legnehezebb feladatai közé tartozik. A glikozil donor anomer konfigurációjával általában nem lehet kontrollálni a kialakuló glikozidos kötés térállását, mivel a glikozilezés döntően monomolekuláris ( $S_N1$ ) mechanizmus szerint megy végbe (7. ábra). Ennek egyik oka, hogy a gyűrűs oxigén

készségesen stabilizálja a kialakuló kationt, a másik ok pedig az akceptor hidroxilcsoportjának csekély nukleofilitása.



7. ábra. A diszacharidképzés általános sémája

A glikozilezés sztereoszelektivitását közvetlenül két tényező befolyásolja: az anomer effektus, valamint a glikozidos centrum szomszédságában lévő csoport résztvevő vagy nem-résztvevő jellege. Az anomer effektus az axiális térállású glikozidos kötés kialakulásának kedvez (ez általában  $\alpha$ -glikozidos kötés), mert ennél a térállásnál a gyűrűs oxigénatom nemkötő elektronpárja (HOMO:  $n$ ) és az  $\alpha$ -glikozidos kötés lazító pályája (LUMO:  $\sigma^*$ ) között stabilizáló hatású átlapolás valósul meg (8. ábra).



8. ábra. Az anomer effektus

A glikozidos kötés és a szomszédos, C-2 szubsztituens térállása alapján a következő kötéstípusokat különböztetjük meg (9. ábra):

$\beta$ -1,2-*transz*-glikozidok (pl.  $\beta$ -D-glükó- és galaktopiranozidok,  $\beta$ -L-fukopiranozidok),

$\alpha$ -1,2-*transz*-glikozidok (pl.  $\alpha$ -D-mannopiranozidok,  $\alpha$ -L-ramnopiranozidok),

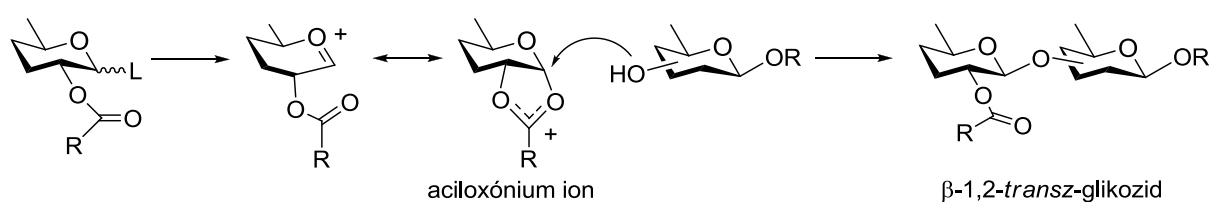
$\alpha$ -1,2-*cisz*-glikozidok (pl.  $\alpha$ -glükó-, galakto- és fukopiranozidok) és

$\beta$ -1,2-*cisz*-glikozidok (pl.  $\beta$ -manno- és ramnopiranozidok).



9. ábra. A glikozidos kötés típusai

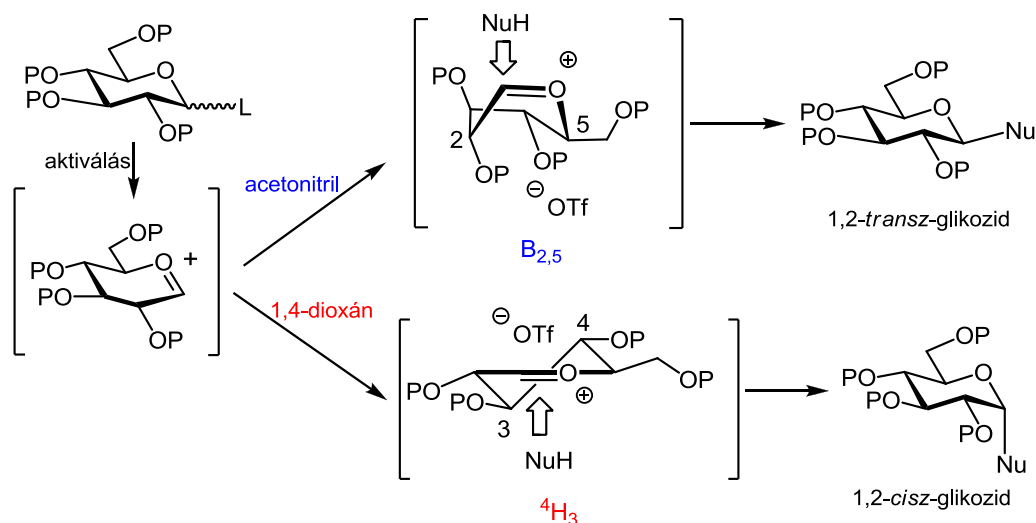
Közvetlen irányítással csak az 1,2-*transz*-glikozidok szintézisét tudjuk előidézni, ehhez a glikozidos centrum szomszédságában résztvevő tulajdonságú (általában acil) védőcsoportot kell kialakítani. A glikozil donorból aktiválás hatására képződő oxokarbénium ion a C-2 helyzetű acilcsoport részvételével intramolekuláris reakcióban dioxokarbénium ionná alakul át, amely lefedi az anomer centrum egyik oldalát. Így a nukleofil csak az ellentétes oldalról tudja megközelíteni a glikozidos szénatomot, és 1,2-*transz*-glikozid képződik (10. ábra). Ily módon a leggyakoribb kötéstípusok közül könnyen előállíthatók a  $\beta$ -D-glüko- vagy galaktopiranozidok ( $\beta$ -1,2-*transz* kötés), és az  $\alpha$ -D-mannopiranozidok ( $\alpha$ -1,2-*transz* kötés).



10. ábra. A C-2 helyzetű résztvevő csoport irányító hatása glikozilezési reakcióban

Az 1,2-*cisz*-glikozidok képzésénél szükséges, de nem elégséges feltétel, hogy a C-2 helyzetben nem-résztvevő szubsztituens legyen. Az  $\alpha$ -D-glükózidos és galaktózidos kötés viszonylag könnyen képződik az anomer effektus irányító hatása miatt. A  $\beta$ -D-mannozidokban található  $\beta$ -1,2-*cisz* kötés kialakítása a legnehezebb glikozilezési feladat, mert a C-2 szubsztituenssel nem irányítható, és az anomer effektus az ellentétes izomer kialakulásának kedvez. Erre a problémára a klasszikus megoldás a megfelelő  $\beta$ -glükózid szintézise, ami utólagos C-2 epimerizációval alakítható át  $\beta$ -mannoziddá. Az utóbbi időben kifejlesztett módszer az úgynevezett kipányvázott glikozilezés (*tethered glycosylation* vagy *intramolecular aglycon delivery*),<sup>37</sup> amikor az akceptort időleges kötéssel a donor  $\beta$ -oldalához rögzítik, így aktiválás hatására az akceptor csak a rögzített oldalról tudja támadni a glikozidos centrumot. A  $\beta$ -mannozilezés területén áttörést hozott Crich munkássága.<sup>38</sup> Legjelentősebb eredménye a mannozil-triflátok mint glikozil donorok bevezetése: tioglikozid vagy sulfoxid donorból a reakcióelegyben *in situ* képződő  $\alpha$ -mannozil-triflát inverzióval reagál az akceptorral, és jó hozammal adja a  $\beta$ -mannozidot.<sup>38</sup> A glikozilezés bonyolultságát jelzi, hogy a feltételezett  $S_N2$  mechanizmus ellenére a reakció sztereoselektivitása csak akkor megfelelő, ha a mannozil donor 4,6-*O*-benzilidén-acetál védőcsoportot tartalmaz.

Mai ismereteink szerint a glikozilezési reakció sztereokémiai kimenetelét (vagyis a kialakuló glikozidos kötés térállását) döntően a donor molekulából képződő oxokarbénium ion konformációja határozza meg.<sup>39</sup> Ha a legalacsonyabb energiájú konformációban a glikozidos centrum inkább az  $\alpha$ -oldalról közelíthető meg, akkor  $\alpha$ -szelektivitás érvényesül, ellenkező esetben pedig  $\beta$ -szelektivitás. A donor különböző szubsztituensei, elsősorban elektronos hatások révén, befolyásolják a különböző konformerek energiatartalmát, így módon a glikozidos centrumtól távol elhelyezkedő szubsztituenseknek is jelentős a hatása a glikozilezés sztereokémiájára. Az oldószerek irányító hatása is abban rejlik, hogy a különböző konformációs formákat különböző mértékben stabilizálják.<sup>39</sup> Glükózil-triflát modellen végzett kvantumkémiai és molekuladinamikai számítások alapján az acetonitril  $\beta$ -glikozidképződést elősegítő hatása úgy magyarázható, hogy ebben az oldószerben az aktív oxokarbénium intermedier legalacsonyabb energiállapotú formája a  $B_{2,5}$  kád konformáció, amelyhez  $\alpha$ -oldalról koordinálódik a triflát-ellenion, így ezt az intermediert a nukleofil csak  $\beta$ -oldalról tudja támadni. Az éter-típusú oldószerekben viszont a  ${}^4H_3$  félszék konformáció  $\beta$ -oldali ellenionnal a legstabilabb átmeneti állapot, ami csak  $\alpha$ -oldalról glikozilezhető (11. ábra).<sup>39a</sup>



11. ábra. Az oldószerek sztereoirányító hatásának magyarázata a *konformer és ellenion eloszlás hipotézis*<sup>39a</sup> alapján

A kialakuló glikozidos kötés térállása természetesen nemcsak a donortól függ, hanem a reaktánsoktól és a reakciókörülményektől is. A szeteroszelektivitást befolyásolja a glikozilezendő hidroxilcsoport nukleofilitása és az akceptor valamennyi szubsztituense, az aktivátor, az aktivátorból képződő anion minősége (a karbéniumion ellenionjaként) és a reakció hőmérséklete is.

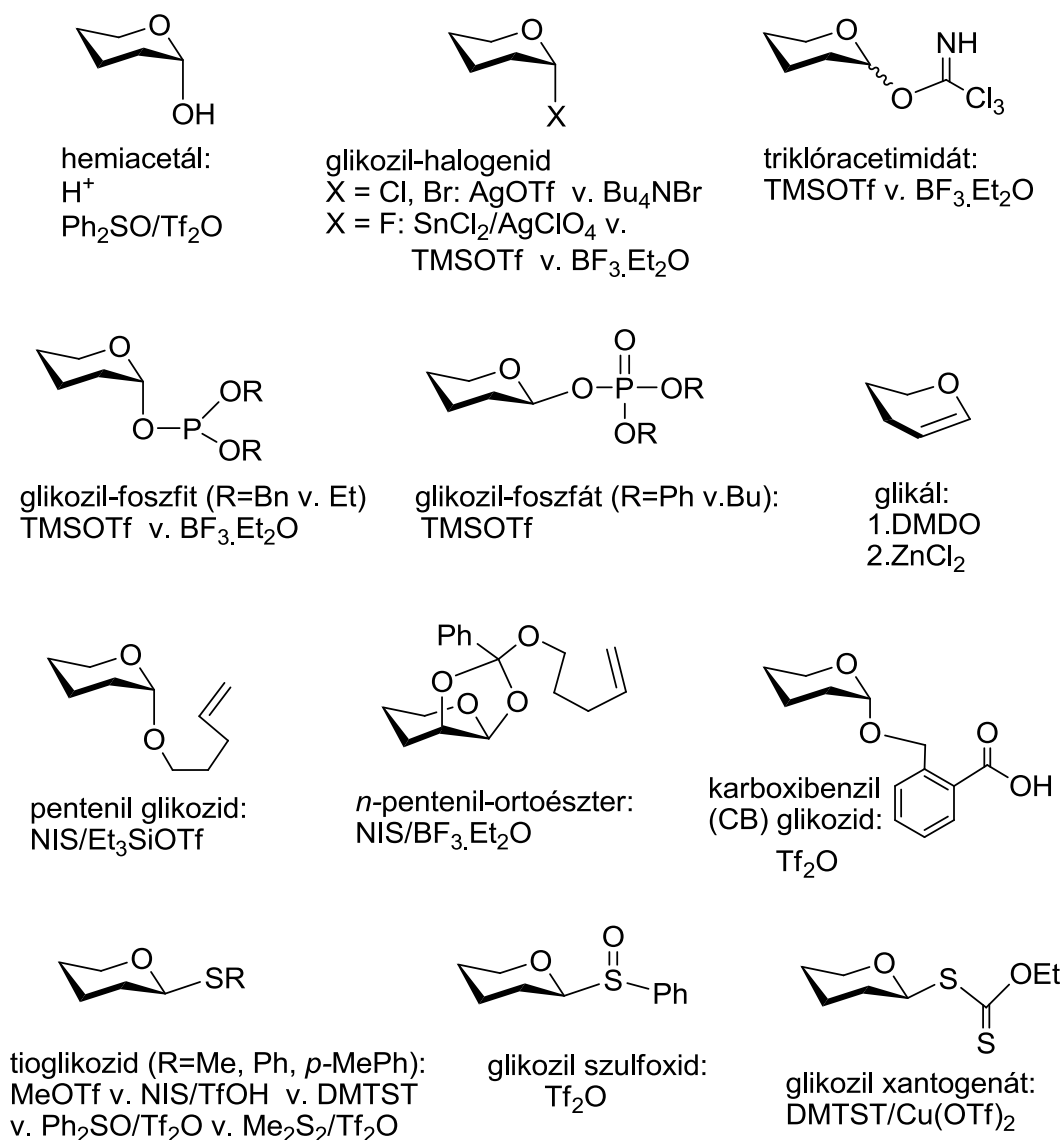


## 2.4. Glikozil donorok, glikozilezési módszerek

A glikozilezési reakció lejátszódásához a glikozil donor anomer csoportját aktiválni kell egy megfelelő elektrofil reagenssel (E), ennek hatására az anomer csoport leválk, és a képződő glikozilium kation reagál az akceptor megfelelő hidroxilcsoportjával. (Glikozidokat lehet képezni *O*-alkilezéssel lúgos körülmények között, valamint glikálókra történő addícióval is, de ezeknek a módszereknek jóval kisebb a jelentősége, mint a klasszikus nukleofil szubsztitúciós reakcióknak.)

A glikozilezés hatékonysága szempontjából kulcsfontosságú az anomer távozó csoport megválasztása. Magasabb tagszámú oligoszacharidok szintézisének egy adott glikozilezési lépés megtervezésekor nemcsak a donor, hanem az akceptor anomer védőcsoportjának megválasztása is nagyon fontos. Amennyiben az előállított di- vagy oligoszacharidot donorként használjuk a szintézis következő fázisában, akkor az akceptort olyan anomer védőcsoporttal célszerű ellátni, amely egyben távozó csoport is, vagy könnyen távozó csoporttá alakítható. A 12. ábrán az elterjedten használt glikozil donorokat és leggyakoribb aktiválási módjaikat foglaltam össze, a teljesség igénye nélkül.

A glikozil donorokat anomer távozó csoportjuk szerint két nagy csoportra oszthatjuk. A nagyon jó távozó csoportot tartalmazó donorokat (pl. glikozil-bromidok, kloridok, imidátok, foszfátok) közvetlenül a glikozilezési lépés előtt kell kialakítani, és csak donorként alkalmazhatók. A „stabil” vagy potenciális távozó csoportok (pl. fluoridion, pentenil-, alkil/aril- vagy foszfátcsoport) előnye, hogy valójában anomer védőcsoportok, ezért akceptorokon is szerepelhetnek, ugyanakkor megfelelő aktiválás hatására jó távozó csoporttá válnak, vagy könnyen lecserélhetők jó távozó csoportra.



$Tf_2O$ : trifluormetánszulfonsav-anhidrid;  $AgOTf$ : ezüst-trifluormetánszulfonát  
 $TMSOTf$ : trimetilszilil-trifluormetánszulfonát; DMDO: dimetil-dioxirán;  
 $NIS$ : N-jód-szukcinimid;  $TfOH$ : trifluormetánszulfonsav  
 $DMTST$ : dimetil(metiltio)szulfónium-triflát

12. ábra. Glikozil donorok és leggyakoribb aktiválási módjuk

A hemiacetálok egyik csoportba sem sorolhatók, hiszen nem tartalmaznak anomer védőcsoportot. A klasszikus Fischer módszerrel (szabad cukor savkatalizált reakciója alkohollal)<sup>40</sup> kizárólag egyszerű alkoholok glikozidjai állíthatók elő. Ugyanakkor nagyon hatékony glikozilszulfónium-triflát donor képezhető hemiacetálból *in situ*, difenilszulfoxid és trifluormetánszulfonsav-anhidrid hozzáadásával, ilyen módon bonyolult oligoszacharidok szintézise is megvalósítható ún. dehidratív glikozilezésekben.<sup>41</sup>

A glikozil-bromidok és -kloridok hosszú időn keresztül a leggyakrabban alkalmazott donorok voltak az oligoszacharidkémiaiában.<sup>42</sup> Koenigs és Knorr<sup>42a</sup> ismerte fel először, hogy az acil-halogén cukrok nehézfém sókkal vagy -oxidokkal ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ,  $\text{HgBr}_2$ ,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ) aktiválva kiváló glikozil donorok. Helferich módosította a glikozilezést: aprotikus poláris oldószert használt  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  katalizátorral, savmegkötő jelenlétében.<sup>42b</sup> A reakció sztereoszelektivitását számottevően lehetett növelni  $\text{AgOTf}$  aktivátor alkalmazásával.<sup>42c</sup> Mára használatuk jelentősen visszaszorult, de a Lemieux-féle halogenid-katalizálta glikozilezés<sup>42d</sup> még ma is kiváló, elegáns módszer 1,2-*cisz*-glikozidok sztereoszelektív előállítására. Az eljárás lényege, hogy a katalizátor, pl.  $\text{Bu}_4\text{NBr}$  *in situ* anomerizációt idéz elő, a termodinamikailag stabilabb  $\alpha$ -halogenid egyensúlyi reakcióban átalakul a reaktívabb  $\beta$ -anomerre, majd a  $\beta$ -halogenidből *cisz*-glikozid képződik, mivel az ehhez vezető átmeneti állapot a legkisebb energiájú. A glikozil-fluoridok<sup>43</sup> jóval stabilabbak, mint a kloridok és bromidok, ezért akceptor szerepben is előfordulhatnak. Jól használható donorok aril-glikozidok<sup>44</sup> és komplex természetes anyagok szintézisében.

A glikozil-triklóracetimidátok<sup>45</sup> széles körben alkalmazott, nagyon hatékony donorok. Hatékonyságukra jellemző, hogy a csökkent reaktivitású uronsavakat hosszú időn át kizárólag imidát formában tudták glikozil donorként használni. Természetesen az imidátok sem nyújtanak univerzális megoldást – nem véletlen, hogy ennyiféle donor létezik –, a természetben  $\alpha$ -glikozidok formájában előforduló szialsav-glikozidok szintézisére pl. nem alkalmasak, mivel imidát donorral kizárólag  $\beta$ -szialil glikozidok képződnek. Erre a problémára nyújtanak megoldást többek közt a glikozil-foszfátok,<sup>46</sup> xantogenátok<sup>47</sup> és a tioglikozidok.

Habár régóta ismert, hogy a glikozidok bioszintézise glikozil-foszfátokon keresztül valósul meg, kémiai szintézisben 1989-ben alkalmaztak először glikozil-foszfát donort.<sup>48</sup> Viszonylag sokoldalúan hasznosíthatók, mivel elég stabilak, és megfelelő védőcsoportkombinációval akceptorként is szerepelhetnek.

Danishefsky dolgozta ki a glükálok kétlépéses aktiválását: az első lépésben dimetildioxiránnal (DMDO) *in situ* képződik a tényleges donor, az 1,2-anhidrid, ami a következő lépésben cink-kloriddal aktiválható.<sup>49</sup> Ez a módszer kiválóan alkalmazható iteratív szintézisekben.

Az *n*-pentenil glikozidok nagyon stabil, ugyanakkor halogenidekkel könnyen aktiválható glikozil donorok, ennek során az aglikon jódmetil-tetrahidrofurán formában hasad le, visszahagyva a glikozilium-kationt. Fraser-Reid a pentenil-glikozidoknál vezette be az

„armed” (aktivált vagy nagyon reaktív) és „disarmed” (dezaktivált vagy nem reaktív) fogalompárt.<sup>50</sup> A benzilezett pentenil glikozidok „armed”, az acetilezettek pedig „disarmed” tulajdonságúak, és az armed változattal a szabad hidroxilt tartalmazó disarmed származékok glikozilezhetők. Az armed-disarmed koncepció nagyon jól alkalmazható más donorokra, pl. tioglikozidokra is, és alapját képezi a kemoselektív glikozilezési stratégiának: a donor és akceptor azonos anomer csoportot de különböző (armed-disarmed) védőcsoportokat tartalmaz, vagyis a donor szelektív aktiválhatóságát a védőcsoportok különbözősége biztosítja

A glikozilezési reakciók 2-*O*-acil védőcsoportot tartalmazó donoroknál gyakran ortoészter intermediereken keresztül mennek végbe. Az ortoészterek mint glikozil donorok tehát régóta ismertek, de használatuk nem terjedt el széles körben. Ezen a területen hatékony újjáépítésként Fraser-Reid bevezetette az *n*-pentenil-ortoésztereket,<sup>51</sup> amelyek a pentenil-glikozidokhoz hasonlóan aktiválhatók, ugyanakkor stabilak, így kiválóan használhatók akceptorként is.

A karboxibenzil-glikozidokkal (CB) végrehajtott glikozilezésnél a karbéniumion-képződés hajtóereje az, hogy az anomer csoport az aktivátorral (Tf<sub>2</sub>O) vegyes anhidridet képez, majd egy belső nukleofil támadás után lakton formában kihasad.<sup>52</sup> A karboxibenzil-glikozidok hatékonyan alkalmazhatók  $\beta$ -mannozidok szintézisében.

Legsokoldalúbban talán a tioglikozidok használhatók. Nagyon stabilak, nem-tiofil aktiválású reakciókban kiváló akceptorok, ugyanakkor rendkívül változatos módon hasznosíthatók donorként is. Közvetlenül aktiválhatók jodóniumionnal,<sup>53</sup> alkilező<sup>54</sup> vagy szulfenilező<sup>55</sup> aktivátorokkal. Kemoselektív glikozilezésekben reaktivitásuk nemcsak a cukor-hidroxilok védőcsoportjaival, hanem a tio-védőcsoporttal is hangolható: az alkiltio-csoportok jóval reaktívabbak, mint az ariltio-csoportok, és utóbbiak reaktivitása tovább módosítható az arilcsoport szubsztituálásával. Ha mégsem a tioglikozid forma a megfelelő donor, akkor egyetlen lépésben átalakíthatók egyéb reaktív donorrá (oxidációval szulfoxiddá,<sup>56</sup> elemi brómmal pedig glikozil-bromiddá).

A glikozilezési módszerek zavarba ejtő bősége annak eredménye, hogy minden oligoszacharidszintézis egyedi probléma, amelyhez meg kell találni az egyedi megoldást: megfelelő teljesítőképességű donort és aktiválási módszert kell keresnünk a glikozilezési lépésekhez, és gondosan meg kell terveznünk a védőcsoportstratégiát, szem előtt tartva, hogy a védőcsoportok jól szolgálják sztereokémiai céljainkat, megfelelően befolyásolják a reaktivitást, és a szintézis végén el tudjuk őket távolítani. Ez valóban összetett feladat, és az alapos elméleti felkészültség mellett is szükségünk van intuíciónak és szerencsének, hogy az elméletileg jó lehetőségekből a gyakorlatban is jól működőt válasszuk ki.

A kémiai szintézissel összehasonlítva könnyű megoldásnak tűnhet az enzimátikus glikoilezés.<sup>57</sup> Az oligoszacharidok bioszintézisét segítő glikozil-transzferázok, valamint a glikozidok hidrolízisét végző glikozidázok egyaránt felhasználhatók glikozidok szintézisére. Tévedés azonban azt hinni, hogy az enzimek mint regio- és sztereoszelektív katalizátorok szükségtelessé teszik a szintetikus munkát. Ez csak a kisebb hatékonysággal alkalmazható glikozidázokra igaz, a transzferázok azonban csak specifikus szubsztrátumokat fogadnak el, amelyeket bonyolult kémiai szintézissel kell előállítani. További korlátot jelent, hogy az enzimek gyakran drágák, és számos monoszacharidhoz és kötéstípushoz nem is létezik megfelelő enzim. A gyakorlatban egyszerűbb, kisméretű, gyakori cukrokból felépülő oligoszacharidoknál lehet a kémiai szintézis alternatívája az enzimátikus szintézis. Ezen kívül jól alkalmazható a kemoenzimátikus módszer, amikor a kémiai lépések közé beillesztenek egy-egy jól kidolgozott enzimátikus glikozilezést a kémiai szintézissel legnehezebben megoldható reakciók kiváltására; pl. a szialsav megfelelő pozíciókba történő beépítését különböző baktériumokból nyert  $\alpha$ -(2-3)- vagy  $\alpha$ -(2-6)-szialil-transzferázzal oldják meg.<sup>57b,c</sup>

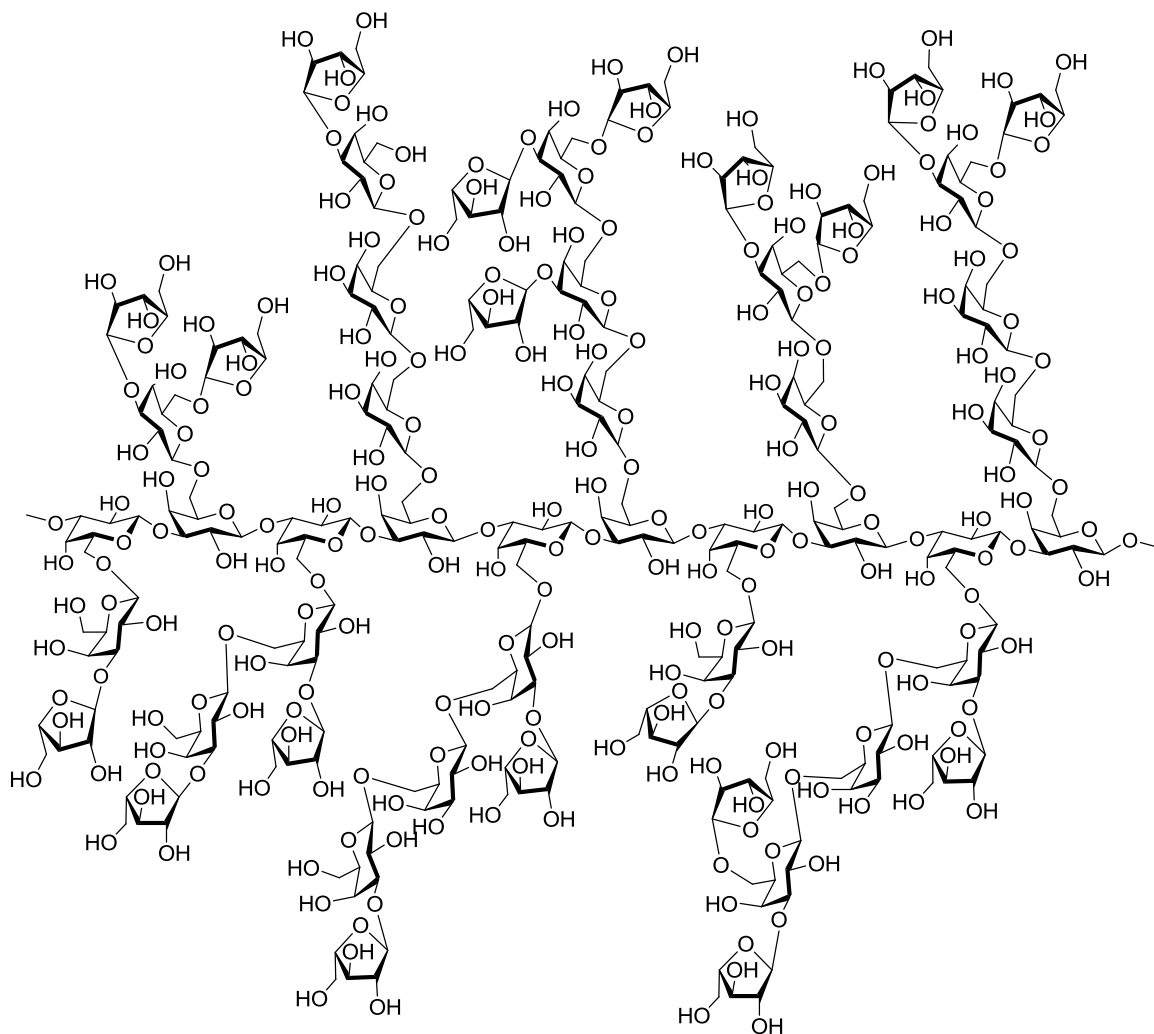
### 3. Növényi arabinogalaktán oligoszacharidok szintézise

#### 3.1. A növényi sejtfal arabinogalaktánok felépítése és biológiai szerepe

A növényi sejtfal nagyon összetett, extracelluláris szerv, amely a növények szinte valamennyi élettani folyamatában kulcsszerepet játszik, támasztóanyagként szolgál, részt vesz a sejtosztódásban és a növekedésben éppúgy, mint az érés és az öregedés folyamatában.<sup>58</sup> A fiatal növények vékony, gyorsan növekvő elsőrendű sejtfalát több mint 90%-ban poliszacharidok alkotják, melyek közül legnagyobb mennyiségben cellulóz fordul elő. Mintegy 150 cellulóz lánc hidrogénhidakkal összetapadva kristályos szálakat, mikrorostokat képez, és ezek a cellulózrostok egy kovalens és nemkovalens keresztkötésekkel összekapcsolt poliszacharid mátrixba ágyazódnak be. A mátrix átveszi és szétoszlatja a rostokra nehezedő nyomást, így megakadályozza a váz törékenységet és biztosítja a sejtek és szövetek rugalmasságát. A poliszacharid mátrixot pektinek, proteinek és hemicellulózok alkotják. A pektin poliszacharidok fő komponensei a homogalakturonán, valamint az I- és II-típusú ramnogalakturonánok.

A pektin polimerek közé tartoznak az arabinogalaktánok is, melyeknek szintén két típusa van.<sup>58,59</sup> Az I-típusú arabinogalaktánok valamennyi kétszikű növényben előfordulnak, vagy önálló láncként vagy a ramnogalakturonán-I oldalláncként. Főláncuk (1-4)- $\beta$ -kötéssel felépülő galaktán, amelyhez elvétele kapcsolódik egy-egy rövid, legfeljebb 4 monoszacharidból álló L-arabinofuranozil oldallánc.

A II-típusú arabinogalaktánok a legáltalánosabban előforduló növényi poliszacharidok, a moháktól kezdődően minden magasabbrendű növény minden egyes sejtjében megtalálhatók.<sup>58-61</sup> Általában aminosavakhoz kötötten, arabinogalaktán proteinek (AGP) formájában fordulnak elő, méretük 60-300 kD. A proteoglikánok családjába tartoznak, mivel túlnyomórészt szénhidrátról állnak, fehérjetartalmuk 2-10% között van. A 30-150 monoszacharid egységből álló szénhidrátrész egy hidroxiprolinban, alaninban, szerinben és treoninban gazdag proteinhez kötődik, általában Gal-O-Hyp, Gal-O-Thre vagy Gal-O-Ser glikozid formájában. Az arabinogalaktán proteinek önállóan, valamint az I-típusú ramnogalakturonánhoz kovalensen kötődve is előfordulnak. Vízoldható polimerek, növényi mintákból a pektin polimerekkel együtt extrahálhatók. Az AG proteinek talán a legbonyolultabb felépítésű természetes makromolekulák, bonyolultságukat a nagyon összetett, többszörösen elágazó szerkezetű szénhidrátrész adja (13. ábra).



13. ábra. A II-típusú arabinogalaktán szerkezete

Fő alkotóelemük a D-galaktopiranoz és az L-arabinofuranóz, de kis mennyiségben D-glükuronsav egységeket is tartalmaznak. A galaktopiranoz egységekből  $\beta$ -(1-3)-kötéssel felépülő főlánc minden egyes monomerjéhez 6-os helyzetben fésűfogszerűen rövid, 1-3 tagú,  $\beta$ -(1-6)-interglikozidos kötést tartalmazó galaktózid lánc kapcsolódik. A „fésűfogakhoz” a 3-as oxigénen keresztül  $\alpha$ -L-arabinofuranozil egységek kapcsolódnak. A terminális galaktózokhoz általában 6-os helyzetben is kapcsolódik egy arabinóz vagy esetenként egy D-glükuronsav molekula. Az AGP-ek kis mennyiségben tartalmazhatnak egyéb komponenseket is, leggyakrabban L-ramnopiranozt, D-mannopiranozt vagy D-xilopiranozt.

Az arabinogalaktán proteinek funkcióikban és előfordulásukban nagy hasonlóságot mutatnak az állati proteoglikánokkal, a glikózaminoglikánokkal (GAG). Mind az AGP, mind a GAG molekulák nagy mennyiségben találhatók az extracelluláris részekben, részt vesznek a sejt-sejt kölcsönhatások biztosításában és a morfogenezis szabályozásában.<sup>62</sup> Az AGP-k

kulcsszerepet játszanak a sejtfal-növekedésében és a növények védekezési rendszerében. Fontos feladatot látnak el a szaporodásban is: biztosítják a pollen megtapadását a bibén, valamint szénhidrát építőanyagot jelentenek a pollencső falának kiépüléséhez.<sup>63</sup>

Az arabinogalaktánok jelentős farmakológiai aktivitással is rendelkeznek, számos elterjedten alkalmazott gyógynövénynél bizonyítottan az arabinogalaktán-protein tartalomhoz kötődik a gyógyító hatás. A kínai népi gyógyászatban sokféle szerepkörben (gyulladásgátló, májvédő, immunerősítő) használt gyógynövények közül a *Bupleurum falcatum* (sarlós buvákfü), a *Lycium barbarum* (ördögceérna) és az *Angelica acutiloba* (angyalgyökér) mindegyikében egy  $\alpha$ -L-arabinofuranózil elágazást hordozó (1-3)- vagy (1-6)-kötésű  $\beta$ -D-galaktán triszacharid szerkezeti elemhez rendelhető a biológiai hatás.<sup>64</sup>

A lángvörös (vagy bíbor) kasvirágot (*Echinacea purpurea*) Észak-Amerikában az indiánok évszázadokon át használták sebek gyógyítására. A kasvirág ma már Európában is elterjedt és népszerű gyógynövény, immunstimuláló hatása bizonyított. Alkoholos kivonata gyógyszerárban kapható készítmény, elsősorban megfázásos tünetek kezelésére használják, de alkalmazható egyéb vírusos és bakteriális fertőzések valamint bőrgyulladások kezelésére is. Az *E. purpurea* sejttenyészetéből izolált ramnogalakturonán és arabinogalaktán poliszacharidok *in vitro* granulocita és CCT (carbon clearance test) tesztje bebizonyította, hogy az immunológiai aktivitás az arabinogalaktán komponensekhez rendelhető.<sup>65</sup> A biológiai aktivitásért felelős minimális egység a feltételezések szerint 3-6 galaktózból  $\beta$ -(1-6)-kötéssel felépülő lánc, amelyhez mono- vagy diarabinofuranózil elágazások kapcsolódnak.

### 3.2. A növényi sejtfal-poliszacharidok szerkezetének meghatározása

A növényi sejtfal szerkezetének pontos, molekuláris szintű megismerését az 1990-es évektől kezdődően a monoklonális antitestek felhasználásán alapuló immunológiai vizsgálatok tették lehetővé. A növényi sejtfal poliszacharidjai immunogén tulajdonságúak, állati szervezetbe juttatva antitestek termelődését váltják ki. A monoklonális antitestek specifikusan egy adott szénhidrátrész (epitóp) ellen termelődnek, és alkalmasak ennek a specifikus szénhidrát egységnek az azonosítására. Ha egy ismeretlen szénhidrát ellen termelődött monoklonális antitest kötődik egy szintetikusan előállított, ismert szerkezetű szénhidrát molekulához, az azt jelenti, hogy az antitest felismerte az epitópját, vagyis sikerült meghatározni azt a szerkezetet, ami a specifikus antitest képződését kiváltotta.

A 90-es évek elejétől kezdődően számos monoklonális antitestet írtak le,<sup>66-68</sup> melyekről kezdetben csupán annyit tudtak, hogy az adott növény mely sejtfal-poliszacharidjai

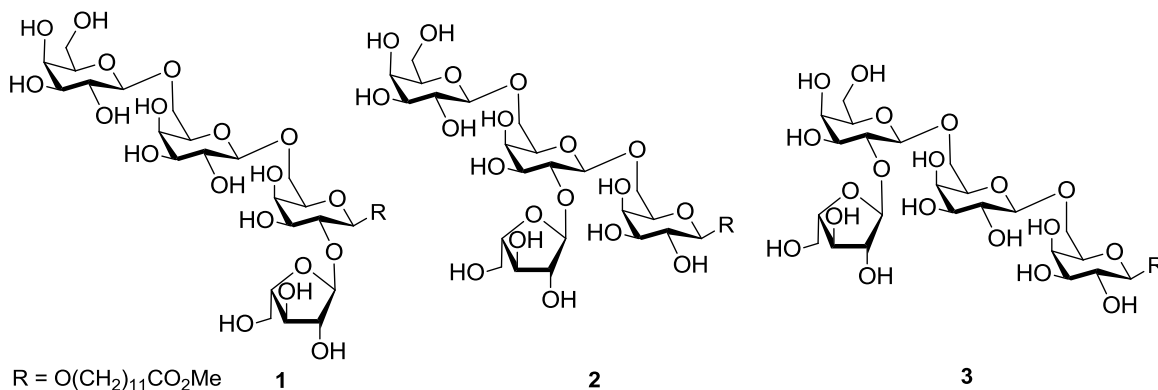


ellen képződtek, a szénhidrát epitópok pontos szerkezetét azonban nem ismerték. Az első, viszonylag pontos epitóp-szerkezetet Albersheim és munkatársai írták le 1995-ben, a hegyi juhar pektin-poliszacharidjai ellen termelődött monoklonális antitestek immunológiai vizsgálatának eredményeként.<sup>68</sup> Indirekt és kompetitív ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) teszt segítségével megvizsgálták, hogy a CCRC-M7 elnevezésű monoklonális antitest milyen erősen kötődik a lángvörös kasvirágból izolált ramnogalakturonánokhoz és arabinogalaktánokhoz, valamint különböző szintetikus oligoszacharidokhoz. A természetes oligoszacharidok közül a 99% galaktóz- és 1% arabinóz-tartalmú frakció mutatta a legnagyobb aktivitást. Kompetitív ELISA tesztben szintetikus (1-5)- $\alpha$ -oligoarabinozidokat, valamint  $\beta$ -(1-4)-,  $\beta$ -(1-3)- és  $\beta$ -(1-6)-kötésű oligogalaktozidokat alkalmazva legerősebb gátlást a  $\beta$ -(1-6)-tri, penta- és hexagalaktánnál tapasztaltak, a  $\beta$ -(1-3)-kötésű galaktozidokhoz viszont egyáltalán nem kötődött az antitest. Az arabinofuranobióz és -tetraóz is mutatott aktivitást, bár 1000-szer kisebbet, mint az oligogalaktozidok. Összegzésként megállapították, hogy a minimális epitóp egy arabinofuranozilezett  $\beta$ -(1-6)-trigalaktán lehet, de elképzelhető egy hosszabb galaktán láncból álló, több mono-, vagy diarabinozil elágazást hordozó nagyobb epitóp is. Ez az epitóp-leírás fontos kiindulópont volt a szintetikus szénhidrátkémikusok számára.

### 3.3. Növényi arabinogalaktán-oligoszacharidok szintézise – irodalmi áttekintés

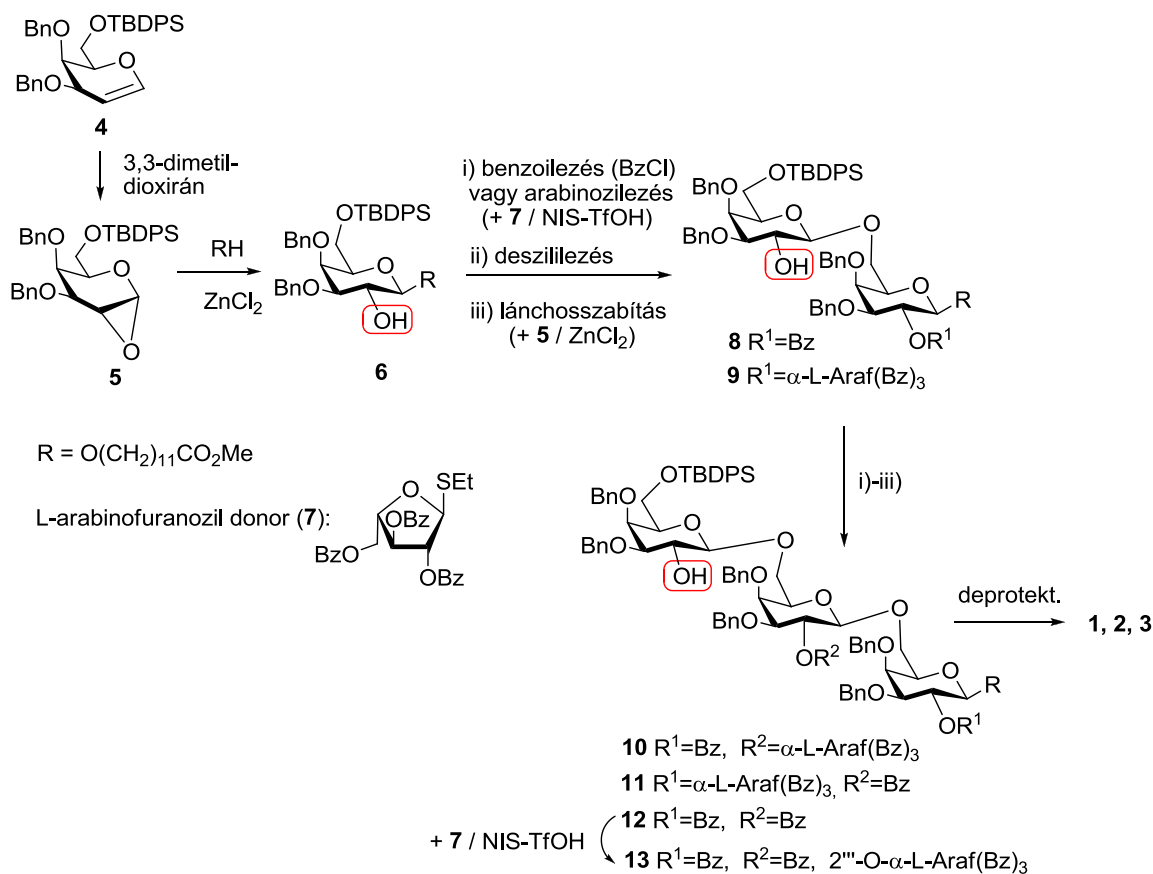
A növényi arabinogalaktánok kémia szintézise különböző kutatócsoportoknál szinte egyidőben kezdődött az 1990-es évek végén. E szintetikus munkákat részben az *Echinacea purpurea* immunstimuláló hatásával foglalkozó kutatások ösztönözték, amelyek arabinogalaktán-oligoszacharidokhoz kötötték a gyógynövény biológiai aktivitását. A másik motiváló tényezőt a növényi sejtfal szerkezetének immunológiai vizsgálatához nyert monoklonális antitestek jelentették, mivel számos esetben arabinogalaktánok voltak a feltételezett epitópok. A szintetikus munkák célja 2-es vagy 3-as helyzetben  $\alpha$ -L-arabinofuranozil elágazást hordozó (1-3)- és (1-6)- $\beta$ -D-galaktán alapvázú oligoszacharidok előállítása volt. Mai ismereteink szerint a növényi arabinogalaktánokban az arabinofuranóz-elágazások a galaktán oldalláncokhoz kizárólag  $\alpha$ -(1-3)-kötéssel kapcsolódnak. Az 1990-es években azonban az volt a feltételezés, hogy a galaktóz 2-OH, és 3-OH csoportja egyaránt lehet elágazási pont, és az *Echinacea purpurea* gyógynövény esetében  $\alpha$ -(1-2)-arabinozilezett galaktán szerkezethez rendelték az immunstimuláló hatást.<sup>59</sup>

Az első szintetikus arabinogalaktánokat van Boom és munkatársai állították elő<sup>69</sup> a hegyi juhar pektin-poliszacharidjai ellen termelődött monoklonális antitest<sup>68</sup> szénhidrát epitópjának azonosítása céljából. Három regioizomer tetraszacharidot állítottak elő 11-metoxikarbonilundecil glikozid formájában, amelyekben az azonos  $\beta$ -(1-6)-trigalaktán váz első, második vagy harmadik egységének 2-es hidroxilcsoportjához kapcsolódott  $\alpha$ -kötéssel egy arabinofuranozil egység (14. ábra).



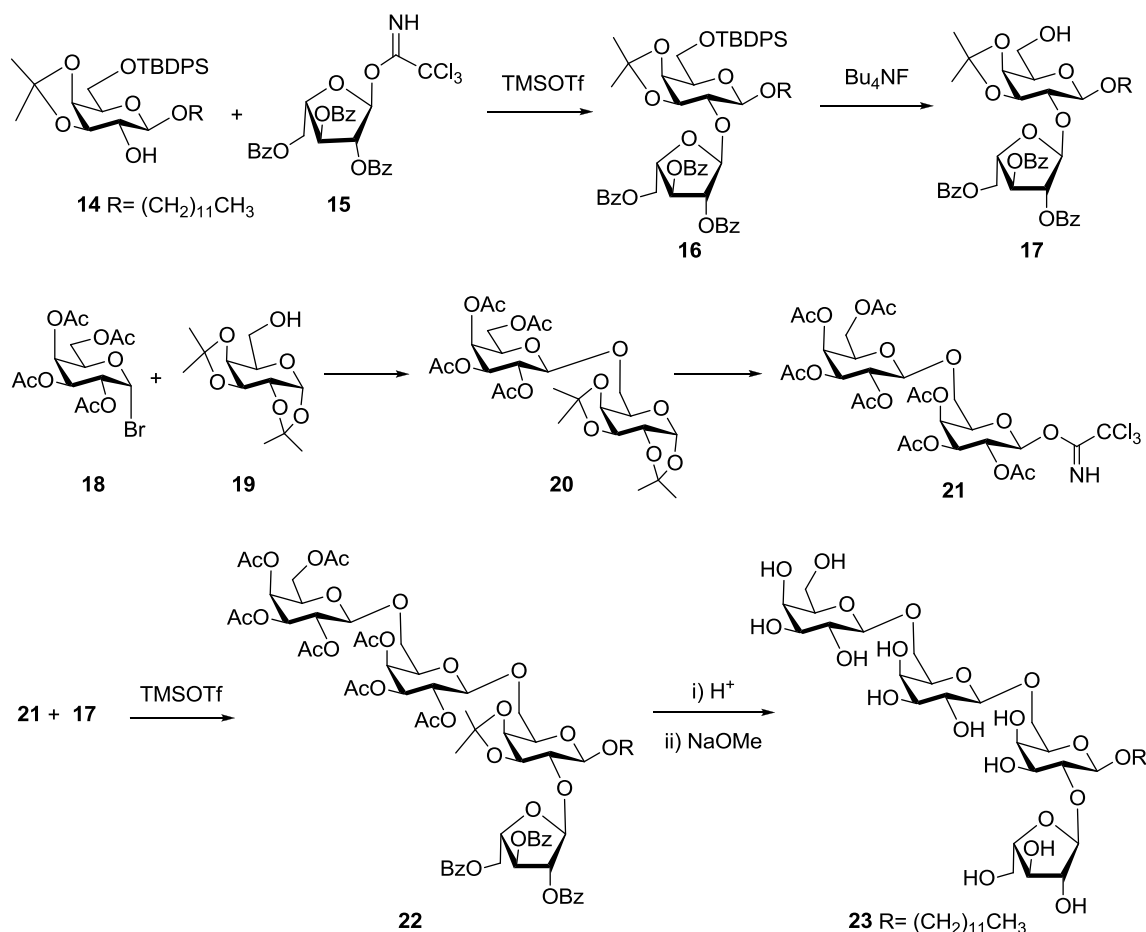
14. ábra. A van Boom csoport által előállított arabinogalaktánok szerkezete

A három szerkezeti izomer főláncának szintéziséhez (15. ábra) a 6-os helyzetben szelektíven eltávolítható szilil védőcsoportot tartalmazó 1,2-anhidrogalaktózt (**5**) használták glikozil donorként, s ezzel egy nagyszerű módszert dolgoztak ki 2-helyzetben elágazást tartalmazó oligoszacharidok szintézisére. A megfelelően védett glikálból (**4**) dimetildioxiránnal *in situ* előállított 1,2-anhidrogalaktózt (**5**) először összekapcsolták a 11-metoxikarbonil-undekanol hídmolekulával; a reakcióban képződött a kívánt  $\beta$ -glikozid és egyúttal felszabadult a 2-OH csoport. Az így nyert **6** intermediert kétféleképpen alakították tovább: kialakították az arabinozil elágazást vagy benzoillel védték a 2-OH csoportot. Ezt követően mindkét vegyületről eltávolították a 6-os szilil védőcsoportot, majd az **5** donorral galaktozilezték a két akceptort. A glikozilezési lépésben ismét felszabadult a 2-helyzetű hidroxilcsoport, így a képződött diszacharidon (**8**) és triszacharidon (**9**) ismét elvégezhették az előbbi reakciósort (i-iii) oly módon, hogy a **8** vegyületből 2'-O-benzoil és 2'-O-arabinozil származékot is előállítottak, míg a **9**-et csak benzoilezték. A deszililezés és lánchosszabbítás után így két tetraszacharidot (**10**, **11**) és egy trigalaktánt (**12**) nyertek, szabad 2-hidroxillal a terminális galaktóz egységen. A **12** trigalaktánt arabinozilezték, majd a három regioizomer tetraszacharidról (**10**, **11** és **13**) eltávolították a védőcsoportokat, és izolálták a célvegyületeket.



15. ábra. A van Boom csoport által előállított arabinogalaktán tetraszacharidok szintézise

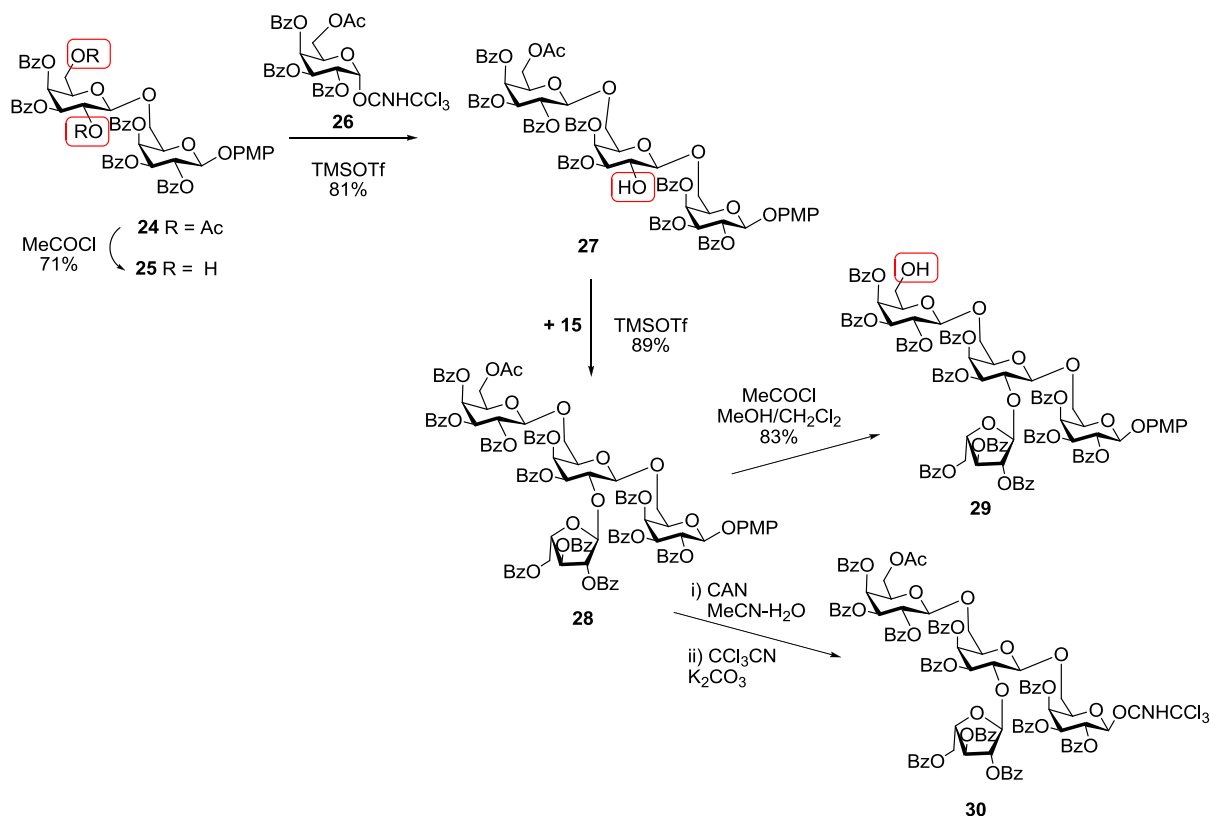
A van Boom csoport által előállított **1** vegyülettel analóg tetraszacharidot (**23**) állítottak elő kínai kutatók dodecil-glikozid formájában (16. ábra).<sup>70</sup> A megfelelően védett dodecil galaktozidot (**14**) 2-es helyzetben arabinozilezték ( $\rightarrow$ **16**), majd a 6-os hidroxilt felszabadították, és az így nyert diszacharid akceptort (**17**) egy peracetilezett digalaktozil-imidáttal (**21**) glikozilezték. A szintézis célja az Albersheim csoport által leírt monoklonális antitest<sup>68</sup> minimális epitópjának meghatározása volt.



16. ábra. A Kong csoport által előállított arabinogalaktán szintézise

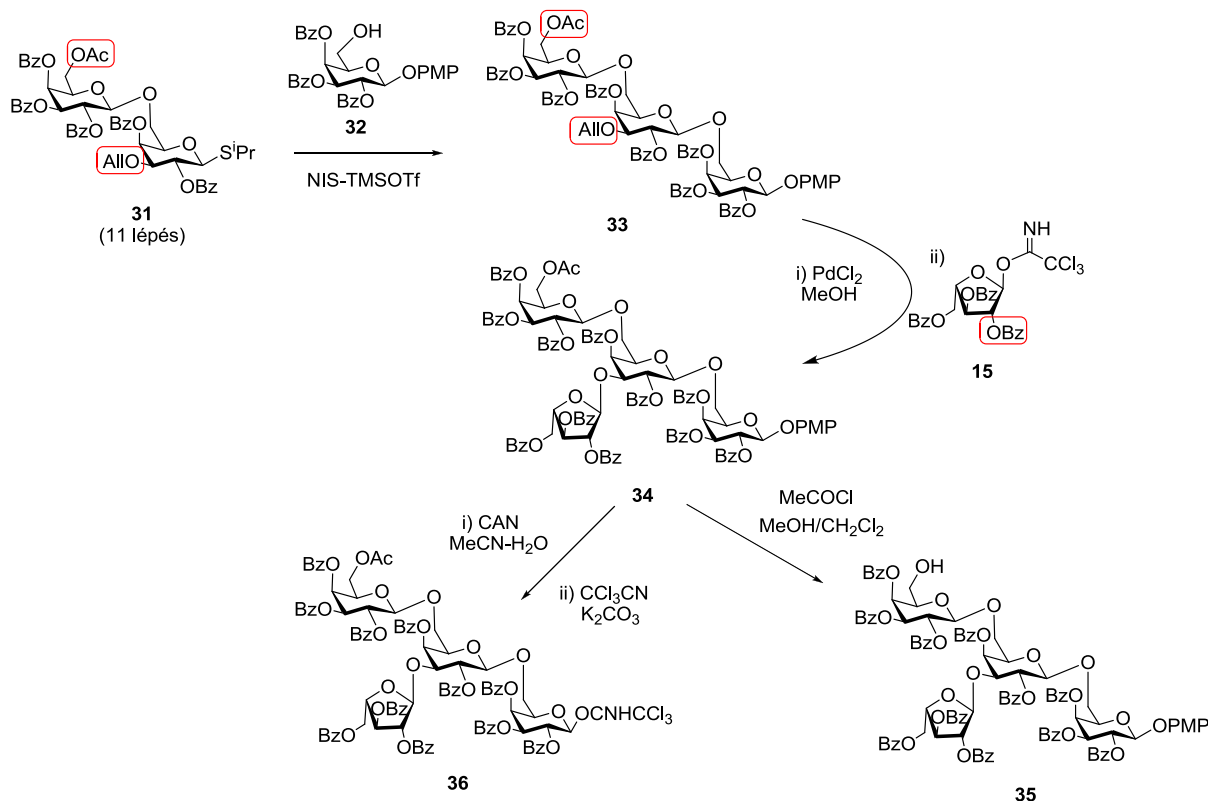
Ugyanez a kínai csoport változatos szerkezetű, 4-20 monoszacharidból álló arabinogalaktánokat állított elő. Az alapváz minden esetben (1-6)- $\beta$ -galaktán lánc volt, melynek minden második vagy harmadik egysége hordozott 2-es vagy 3-as helyzetben elágazást.<sup>71-74</sup> A szintézis lényege a különböző stabilitású észter védőcsoportok kombinációja volt: állandó védőcsoportként benzoátot alkalmaztak, a láncelágazási pontokat a benzoil mellől szelektíven eltávolítható acetil-csoporttal védték. Ilyen módon állították elő a 17. ábrán látható tetraszacharidokat.<sup>72</sup> A kiindulási digalaktózidot (**24**) savas közegben dezacetilezték, a reagens az acetilkloridból metanolban *in situ* képződő sósav volt, amely lassú reakcióban szelektíven lehasította a benzoilek mellől az acetil csoportokat, a képződő akceptor (**25**) így a lánchosszabbítás (6'-OH) és a láncelágazás (2'-OH) helyén is szabad hidroxilcsoportokat tartalmazott. A primer hidroxil lényegesen nagyobb reaktivitását kihasználva először regioszelektív glikozilezéssel meghosszabbították a galaktán láncot, majd kialakították az arabinozil elágazást (**28**). A tetraszacharidot egy lépésben glikozil akceptorra (**29**), kétlépéses

reakcióban pedig donorrá (**30**) alakították át, és a későbbiekben felhasználták váltakozóan (1-2)- és (1-3)- $\alpha$ -L-arabinofuranozil elágazást hordozó arabinogalaktánok szintézisére.



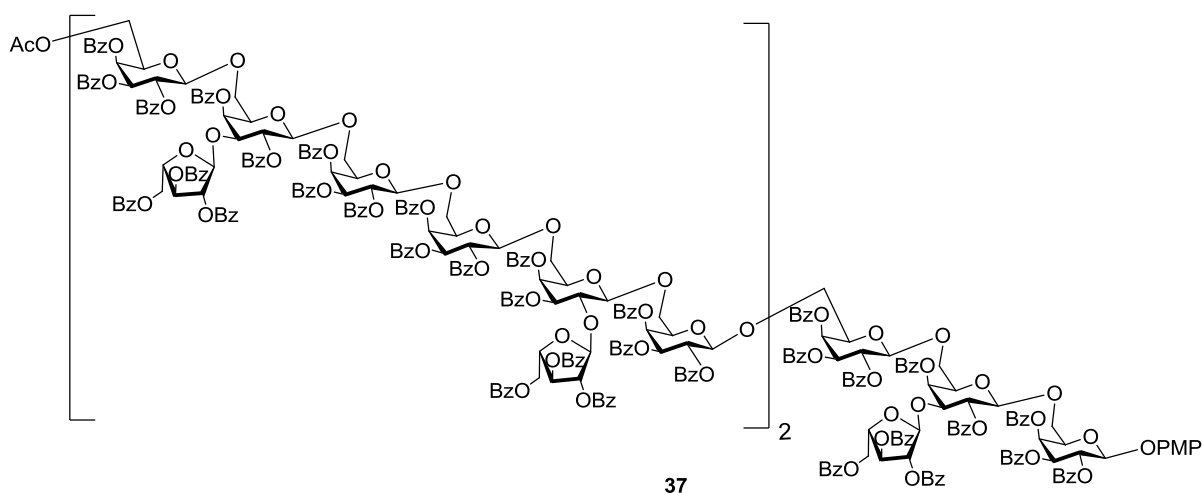
17. ábra. Kong csoport:  $\alpha$ -(1-2)-arabinofuranozil elágazást tartalmazó tetraszacharidok

Az 1-3 láncelágazás kialakításához (18. ábra) a **31** digalaktóz donor 3-OH csoportját időlegesen allil-éter formában védték.<sup>73</sup> Állandó védőcsoportként ebben az esetben is benzoilt alkalmaztak, és acetilezéssel biztosították a 6'-hidroxil szelektív felszabadíthatóságát. A tioglikozid donort a **32** galaktozidhoz kapcsolták, a kapott triszacharidról (**33**) eltávolították az allil védőcsoportot és kialakították az arabinozil elágazást (**34**). A tetraszacharidból végül a szokásos módon donort (**36**) és akceptort (**35**) állítottak elő.



18. ábra. Kong csoport:  $\alpha$ -(1-3)-arabinofuranozil elágazást tartalmazó tetraszacharidok

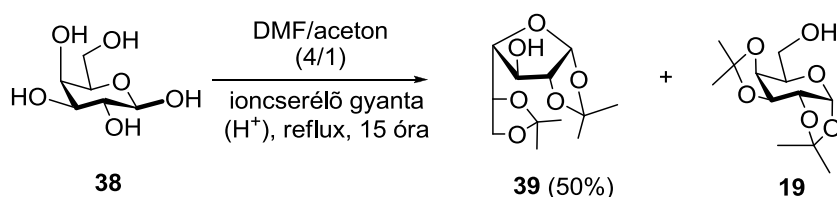
A 17. és 18. ábrán bemutatott négy tetraszacharid építőelem (**29**, **30**, **35** és **36**) váltakozó összekapcsolásával 15 galaktóz egységből felépülő, 5 arabinóz elágazást tartalmazó eikozaszacharidot állítottak elő (19. ábra).<sup>74</sup> A kizárólag észter védőcsoportokat tartalmazó **37** vegyületből egyetlen dezacilezési lépéssel megkapták a szabad végterméket *p*-metoxifenil-glikozid formájában.



19. ábra: Kong csoport: váltakozó, (1-2)- és (1-3)-arabinozil elágazást tartalmazó védett eikozaszacharid szerkezete

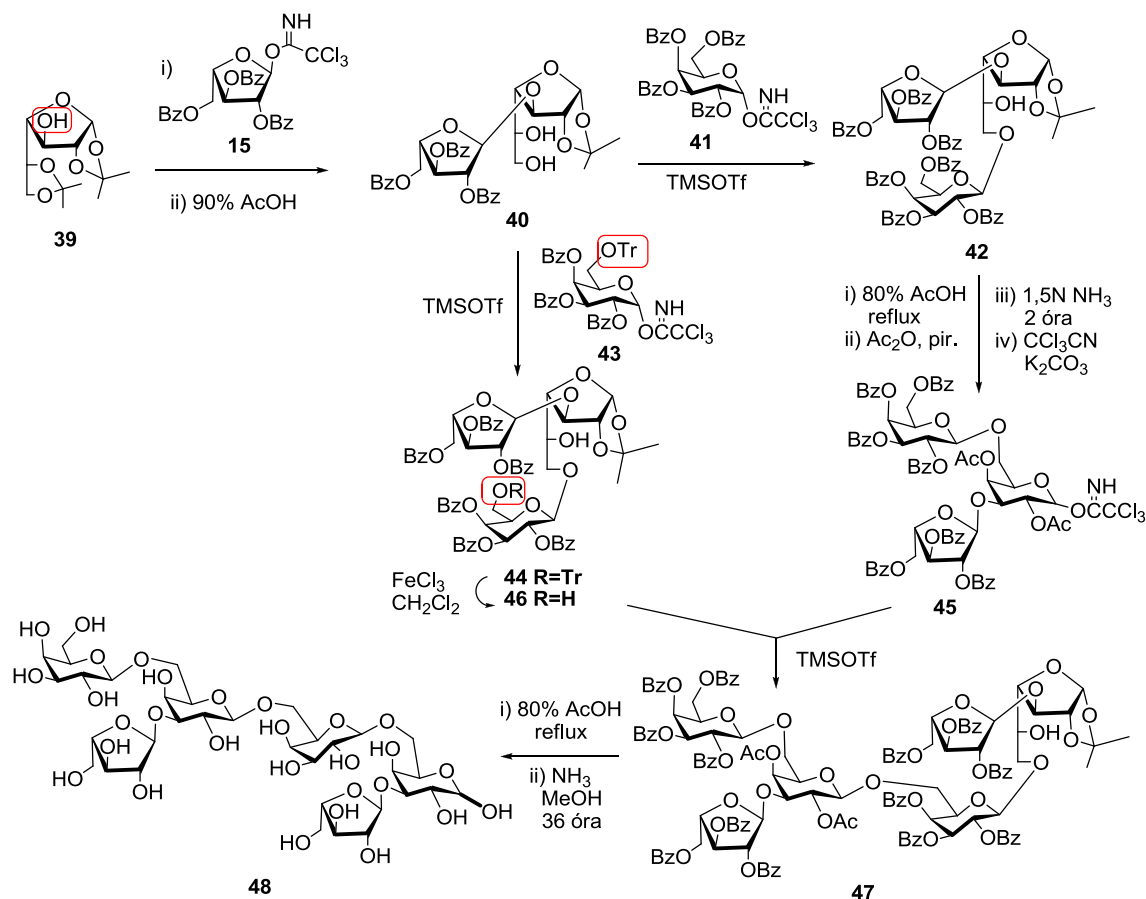
A fent bemutatott stratégia<sup>71-74</sup> hátránya, hogy a megfelelően védett kiindulási diszacharidok szintézise elég hosszadalmas, peracetilezett galaktózból kiindulva 12-14 lépést igényel. A módszer előnye, hogy a tetraszacharid építőelemek gyorsan és hatékonyan állíthatók elő, és nagy varációs lehetőséggel kapcsolhatók össze.

Egy másik kínai kutatócsoport 1,2:5,6-di-*O*-izopropilidén- $\alpha$ -D-galaktofuranóz (20. ábra) felhasználásával hatékony eljárást dolgozott ki 3-as helyzetű elágazást tartalmazó galaktánok szintézisére.<sup>75</sup> Először a kiindulási vegyület jó hozamú szintézisét kellett megoldaniuk, hiszen közismert, hogy a galaktóz acetonnal végzett acetálozási reakciójában a piranózgyűrűs forma (**19**) a főtermék. Kihasnálva, hogy a magasabb hőmérséklet a furanózgyűrűs forma kialakulásának kedvez, DMF-aceton elegyben refluxhőmérsékleten végezték a reakciót, így 50%-os hozammal képződött a furanózgyűrűs acetálszármazék (**39**), amit sikerült kristályosítással kinyerniük a reakcióelegyből.



20. ábra. Az 1,2:5,6-di-*O*-izopropilidén- $\alpha$ -D-galaktofuranóz (**39**) szintézise

Az arabinogalaktánok szintézisének (21. ábra) a **39** vegyület szabad 3-as hidroxilját arabinozilezték, szelektíven eltávolították a labilisabb 5,6-acetál csoportot, és a képződött diol (**40**) primer hidroxilcsoportját szelektíven galaktozilezték kétféle donor molekulával (**40+41**→**42** és **40+43**→**44**). A **42** triszacharidot négy lépésben donorrá alakították, a **44** detritilezésével pedig akceptort állítottak elő egy 3+3 blokk-szintézishez (**45+46**), ami jó hozammal adta a két arabinóz elágazást tartalmazó tetragalaktán célvegyületet (**47**).



21. ábra. Galaktofuranózból kiinduló szintézis (1-3)-arabinozil elágazás kialakítására

Saját munkáinkon kívül mindössze az itt bemutatott szintézisek léteznek (1-2)- és (1-3)-arabinozil elágazású növényi arabinogalaktánokra. Ezek közül a van Boom csoport 1998-as munkája volt az első, ezt követték a mi publikációink 1999 és 2003 között, a két kínai csoport pedig 2000-2005-ben közölte eredményeit.

### 3.4. Arabinogalaktán oligoszacharid-sorozat moduláris szintézise - Saját eredmények<sup>78-81</sup>

#### 3.4.1. Ciklikus izopropilidén-acetál és MIP vegyes acetál védőcsoportkombináción alapuló szintézisterv kidolgozása<sup>78</sup>

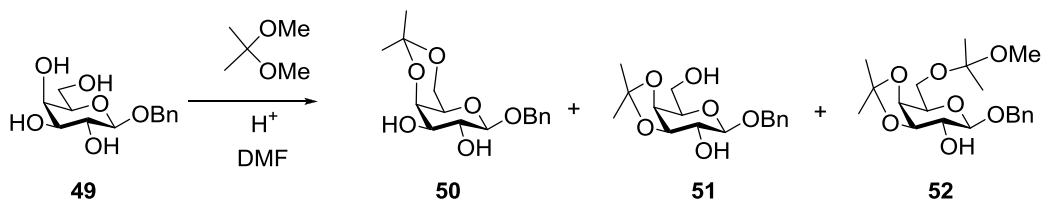
Munkánk célja az *Echinacea purpurea* sejtenyészetéből izolált immunstimuláló hatású poliszacharidok arabinogalaktán komponenseinek szintézise volt. Az akkori feltételezések szerint a biológiai aktivitásért felelős rész egy (1-6)-β-D-galaktán alapvázú oligoszacharid, melyben minden második vagy harmadik galaktóz egység 2-OH csoportjához



mono- vagy (1-5)- $\alpha$ -L-diarabinofuranozil elágazások kapcsolódnak.<sup>59,69</sup> Célul tűztük ki olyan oligoszacharid-sorozat előállítását, amelyben megtalálható valamennyi feltételezett szerkezet.

A korábban bemutatott 1,2-anhidro-galaktóz donoron alapuló van Boom-féle szintézis<sup>69</sup> nagyon elegáns: minden egyes galaktozilezési lépésben láncnövekedés történik, és egyúttal felszabadul a láncelágazás helyén a hidroxilcsoport. Ugyanakkor a megfelelően védett 1,2-anhidro-galaktóz donor szintézise meglehetősen hosszú reakciút igényelt.

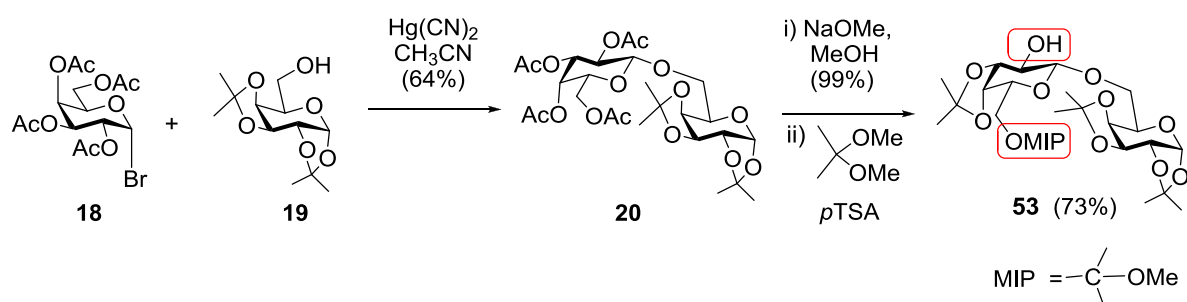
Az általunk kidolgozott módszer egy olyan védőcsoportstratégián alapult, amellyel a galaktóz 3-, 4- és 6-OH csoportja egyetlen lépésben védhető, és egyedül a láncelágazási pont, a 2-OH marad szabadon. Ez az egylépéses védelem 2,2-dimetoxipropánnal végrehajtott izopropilidénezési reakcióban valósítható meg. 1983-ban figyelte meg a Lipták csoport galaktozidok 2,2-dimetoxipropánnal végzett acetálozási reakcióiban, hogy a várt ciklikus acetálok mellett a primer hidroxilon kevert acetál [(metoxidimetil)metil, más néven metoxi-izopropil acetál, MIP] is képződik.<sup>76</sup> Benzil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (**49**) acetálozásakor három terméket izoláltak 5:4:1 arányban: a kinetikus termékként képződő 4,6-*O*-izopropilidén származékot (**50**), a termodinamikusan legstabilabb 3,4-*O*-acetált (**51**), és ennek 6-*O*-MIP származékát (**52**). Olasz kutatók oldószer nélkül, nagy feleslegű 2,2-dimetoxipropánnal végezték galaktopiranozidok izopropilidénezését, és azt találták, hogy főtermékként jó hozammal a 3,4-*O*-izopropilidén-6-*O*-MIP-származék képződik.<sup>77</sup>



22. ábra. Benzil- $\beta$ -D-galaktopiranozid és 2,2-dimetoxipropán reakciója

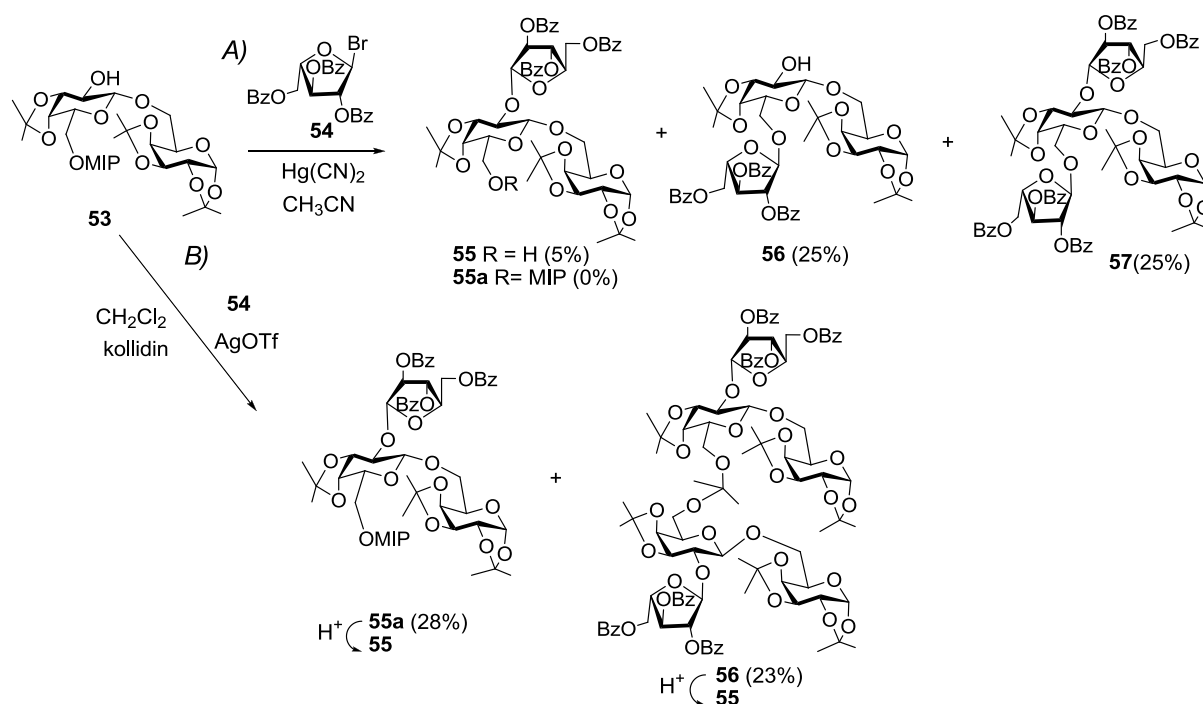
Ez a reakció volt a kiindulópontja az (1-2)-arabinofuranozil elágazást tartalmazó arabinogalaktánok szintézisére irányuló kutatásainknak. Célunk az volt, hogy a ciklikus izopropilidén acetál és MIP vegyes acetál védőcsoportkombináció alkalmazásával olyan digalaktóz akceptor építőelemet (**53**)<sup>78</sup> állítsunk elő, amely a láncelágazás helyén tartalmaz csak szabad hidroxilt, így közvetlenül arabinozilezhető. Mivel a MIP vegyes acetál a ciklikus acetálnál savérzékenyebb, a teljesen acetál-védett digalaktózon arabinozilezés után szelektíven felszabadítható a 6'-OH csoport, és így lehetővé válik a galaktán lánc tetszés szerinti meghosszabbítása.

Az **53** kulcsvegyülethez D-galaktózból kiindulva 2 lépésben előállítottuk az acetobrom-galaktóz donort (**18**), egy lépésben a di-izopropilidén galaktóz akceptort (**19**), majd Helferich körülmények<sup>41b</sup> között összekapcsoltuk a két építőelemet. A képződött **20** diszacharidot dezacetileztük, végül 3',4'-O-izopropilidén-6'-O-(metoxidometil)metil formában egyetlen lépésben védtük a szükséges pozíciókat (**53**).



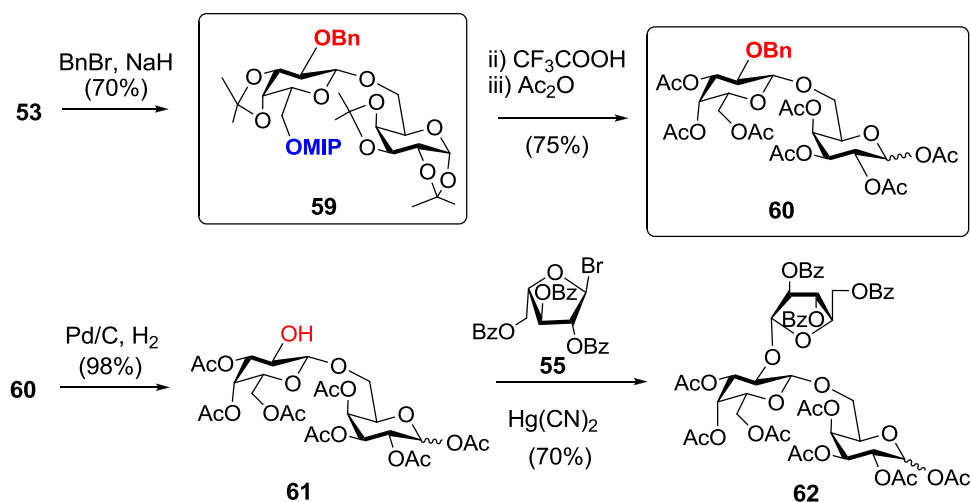
23. ábra. Láncelágazás kiépítésére alkalmas digalaktóz szintézise

Az **53** vegyületet benzoilezett arabinofuranozil donorral (**54**)<sup>82</sup> regáltattuk (24. ábra), ám a várt triszacharid csak kis mennyiségben képződött, mégpedig szabad 6'-OH formában (**55**). Főtermékként a 6'-helyzetben arabinozilezett regioizomer triszacharidot (**56**) és a 2',6'-diarabinozilezett tetraszacharidot (**57**) izoláltuk. A nem várt termékek képződését az okozta, hogy a glikozilezés során az aktivátorból képződő  $\text{HgBr}_2$  hatására a savérzékeny MIP-csoport lehasadt, így a 6'-OH is glikozilezhetővé vált. A hidrolitikus mellékreakció kiküszöbölésére az arabinozilezési reakció körülményeit módosítottuk: a glikozilezést ezüst-trifláttal ( $\text{AgOTf}$ ) aktiváltuk, a keletkező  $\text{HBr}$  megkötésére pedig szimmetrikus kollidint (2,4,6-trimetilpiridin) alkalmaztunk. A MIP hidrolízisét valóban meg tudtuk akadályozni, azonban meglepő módon két termék keletkezett. A kívánt triszacharid (**55a**) mellett képződött egy acetálhíddal összekapcsolt dimer származék is (**56**). Ehhez hasonló, acetálhíddal összekapcsolt származékok ismertek az irodalomból,<sup>37</sup> ugyanis az ún. kipányvázott glikozilezésnél (*intramolecular aglycon delivery*, vagy *tethered glycosylation*) úgy biztosítják a glikozidos kötés kívánt térállását, hogy ilyen acetálhíddal kötik a donor megfelelő térfeléhez az aglikont.



24. ábra. Az **53** digalaktóz arabinozilezése bázis nélkül (A), és bázis jelenlétében (B)

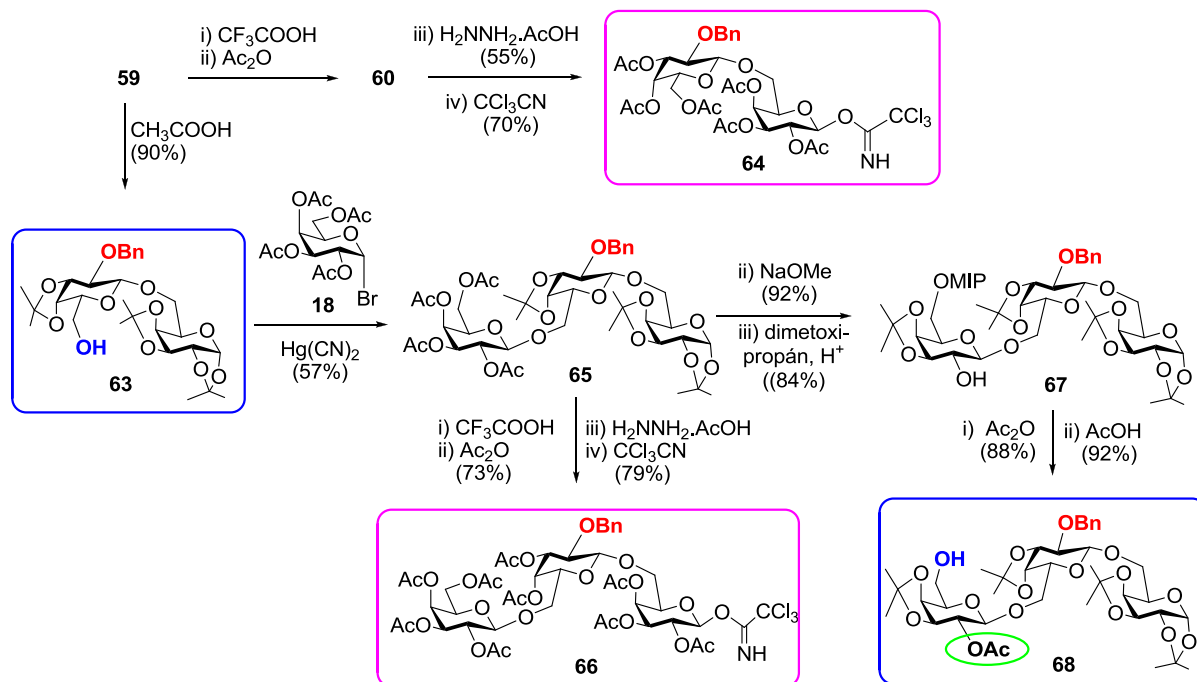
Mind az **55a** triszacharidból, mind az **56** dimer származékából előállítható szelektív hidrolízissal az **55** származék, amely kiváló akceptor építőelem lehet hosszabb galaktán láncú oligomerek szintéziséhez. Ugyanakkor nyilvánvalóvá vált, hogy az **53** vegyület a MIP-acetál túlzott savérzékenysége miatt nem biztosít megfelelő hozamot glikozilezési reakciókban, ezért szintézistervünket módosítottuk. Az **53** diszacharid 2'-hidroxilját átmenetileg benziléter formában védtük (**59**), a MIP-csoport a bázikus körülmények között várakozásainknak megfelelően stabilnak bizonyult (25. ábra). Ezt követően az acetál védőcsoportokat acetilekre cseréltük (**60**), majd szelektíven felszabadítottuk a 2'-OH csoportot és a kapott digalaktóz akceptort (**61**) arabinozileztük. Ezen a reakcióúton kiváló hozammal kaptuk a kívánt **62** triszacharidot. A későbbiekben a 25. ábrán bekeretezve látható két diszacharidból (**59** és **60**) állítottuk elő a magasabb tagszámú galaktán láncok moduláris szintézisére alkalmas donor és akceptor építőelemeket.



25. ábra. A 2'-O-arabinozilezett digalaktóz módosított szintézise

### 3.4.2. Különböző hosszúságú galaktán modulok szintézise<sup>79-81</sup>

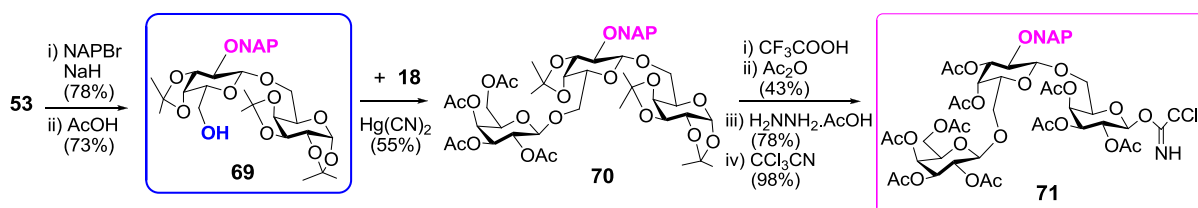
Az **59** vegyületből egyrészt enyhe savas hidrolízissel diszacharid akceptort képeztünk (**63**), másrészt a **60** acetilezett származékon keresztül diszacharid donort állítottunk elő (**64**).



26. ábra Di- és trigalaktán donor és akceptor modulok szintézise

A **63** vegyületből acetobróm-galaktózzal (**18**) végrehajtott kapcsolást követően trisacharid donor (**66**) és akceptor (**68**) származékot is szintetizáltunk. Mivel a potenciális

láncelágazási pontot minden építőelemen benzilcsoport védi, ami szelektíven eltávolítható mind az acetyl-, mind az izopropilidén-csoportok mellől, ezért az egyes elemek összekapcsolása után könnyen kialakítható az (1→2)-arabinofuranozil elágazás. A di-, és triszacharid donorok tetszőleges összekapcsolásával 2+2, 2+3, 3+3, 2+2+2 blokk-szintézisek révén tetra-, penta- és hexagalaktán váz alakítható ki. A di- és triszacharid építőelemek megfelelő kombinálása azt is lehetővé teszi, hogy a képződő galaktán láncon különböző gyakorisággal épüljenek ki az arabinóz elágazások. A **63+64** vagy **63+66** kapcsolásokat követően például minden második, míg a **66+68** kapcsolás után minden harmadik galaktóz egységen lehet láncelágazást kialakítani. A **68** akceptor további előnye, hogy a 2'-OH, és 2''-OH csoportja ortogonális, egymás mellől szelektíven eltávolítható védőcsoportokat tartalmaz, így akár a második, akár a harmadik galaktóz egységen lehetőség van a szelektív arabinozilezésre. Úgy gondoltuk, hogy amennyiben találunk olyan védőcsoportot, amely mind a benzil, mind az acetyl mellől szelektíven eltávolítható, és előállítjuk a **64**, vagy a **66** donornak olyan analóg vegyületét, amely 2'-helyzetben ezt a védőcsoportot tartalmazza, akkor a láncelágazási pontok további variálására nyílik mód. Ebben az időszakban végeztük (2-naftil)metilén acetálok parciális hidrogenolízisére és (2-naftil)metil (NAP) éterek stabilitására és szelektív eltávolíthatóságára irányuló vizsgálatainkat,<sup>82-84</sup> és úgy láttuk, hogy a (2-naftil)metil védőcsoport kiválóan megfelel céljainknak, mivel oxidatív úton eltávolítható a benzil mellől. Az **53** diszacharidot (2-naftil)metil-bromiddal, NaH jelenlétében alkileztük, majd szelektíven felszabadítottuk a 6'-hidroxilcsoportot. Ezt követően meghosszabbítottuk a galaktán láncot (**70**), majd négy lépésben előállítottuk az újabb triszacharid donor építőelemet (**71**), amely az acetyl és benzil mellől is szelektíven eltávolítható NAP-védőcsoportot tartalmazott a 2'-helyzetben.



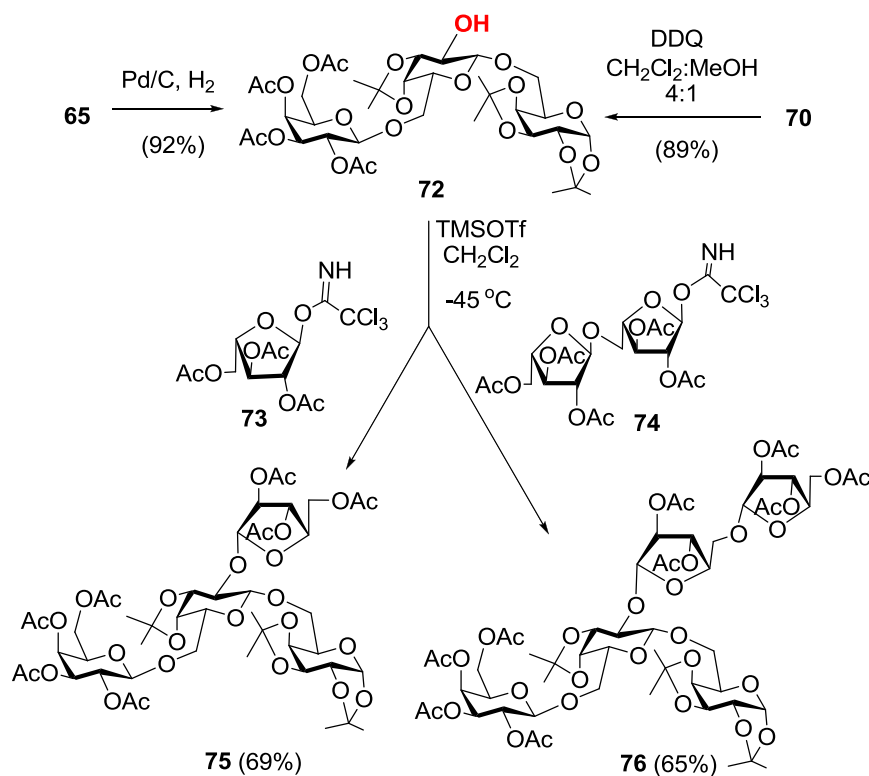
27. ábra. 2-(Naftil)metil (NAP) védőcsoportot tartalmazó triszacharid építőelem szintézise

### 3.4.3. Változatos szerkezetű, mono- és diarabinozilezett arabinogalaktánok szintézise

Az előbbieken bemutatott di- és triszacharid modulok felhasználásával hat újabb arabinogalaktánt állítottunk elő. Valamennyi oligoszacharid β-D-(1-6)-kötésű galaktán vázat tartalmazott, amelyhez mindig α-(1-2)-kötéssel kapcsolódott az L-arabinofuranozil elágazás.

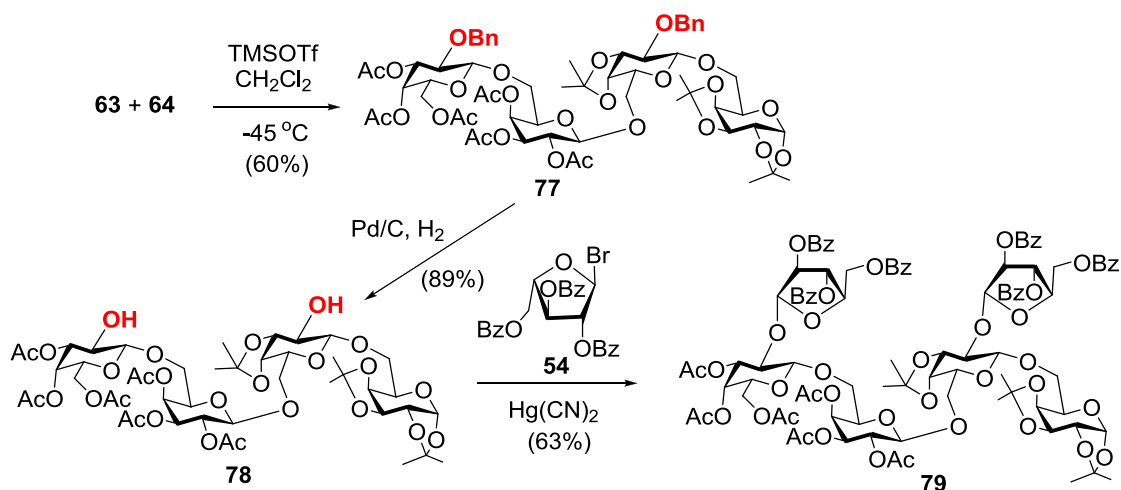
A szerkezetek változatosságát az elágazások gyakorisága, és mérete (mono- és diarabinofuranozil) adta. Nem használtuk ki a modulok által kínált valamennyi lehetőséget, csupán egy-egy képviselőjét állítottuk elő a feltételezett szerkezeteknek.

Alapvázként először a **72** trigalaktán akceptort<sup>80</sup> alkalmaztuk, amelyet kétféle úton is előállítottunk: a **65** 2'-*O*-benzil származékból katalitikus hidrogenolízissel, a (2-naftil)metil-tartalmú **70**-ből pedig DDQ-val. Az utóbbi, egyelektron-transzfer mechanizmusú átalakítás kiváló hozammal ment végbe, bizonyítva, hogy a NAP-védőcsoport oxidatív eltávolítása triszacharid szinten is jól működik. A galaktán lánc felszabadított 2'-OH csoportjához mono- (**73**) és (1-5)- $\alpha$ -diarabinozil (**74**) egységet kapcsoltunk. Mindkét arabinozilezési reakciót triklóracetimidát donorral hajtottuk végre trimetilszilil-triflát katalizátor jelenlétében, és jó hozammal izoláltuk a tri- és tetraszacharid célvegyületet (**75** és **76**, 28. ábra).



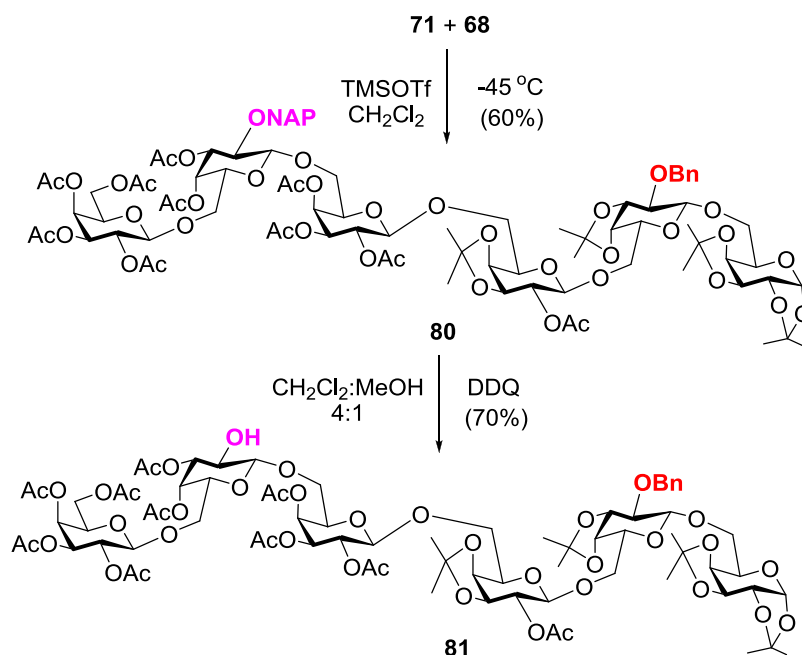
28. ábra. Mono- és diarabinofuranozil elágazást tartalmazó trigalaktánok szintézise

Ezt követően a 26. ábrán bemutatott, 2'-*O*-benzilezett diszacharid modulok összekapcsolásával tetragalaktán láncot alakítottunk ki (**77**), majd a benzil csoportok hidrogenolitikus hasításával felszabadítottuk a láncelágazások helyét (**78**), végül egyetlen glikozilezési lépésben, 5 ekvivalens donor alkalmazásával, 1-1 arabinóz egységet kapcsoltunk a második és negyedik galaktóz 2-es helyzetű hidroxiljához (29. ábra).<sup>79</sup>



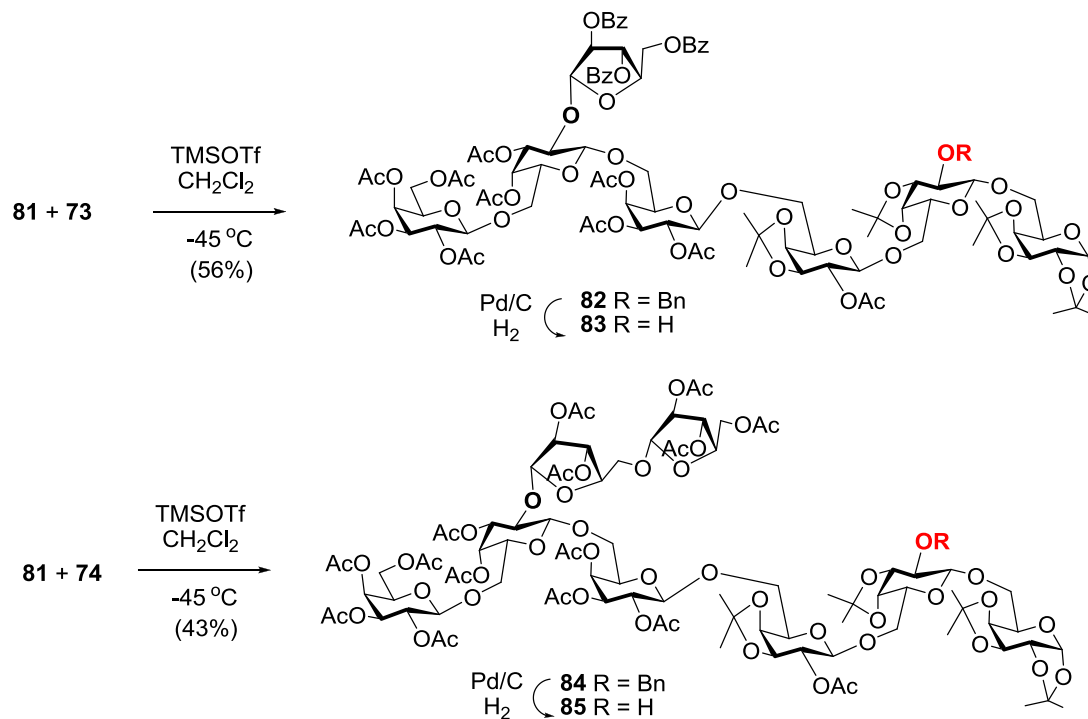
29. ábra. Két (1-2)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid egységet tartalmazó tetragalaktán szintézise

Végül két triszacharid modul összekapcsolásával hexagalaktán vázat állítottunk elő.<sup>81</sup> Donorként a 2'-O-NAP védőcsoportot tartalmazó triszacharidot alkalmaztuk (71), akceptorként pedig a 2'-helyzetben benzilezett származékot (68). A benzil és NAP-csoport szekvenciális eltávolíthatósága lehetővé tette, hogy a glikozilezési lépésben nyert hexaszacharid második és ötödik galaktóz egységén különböző hosszúságú láncelágazásokat alakítsunk ki. Elsőként a naftilmetil-csoportot távolítottuk el az ötödik galaktóz egységről (30. ábra).



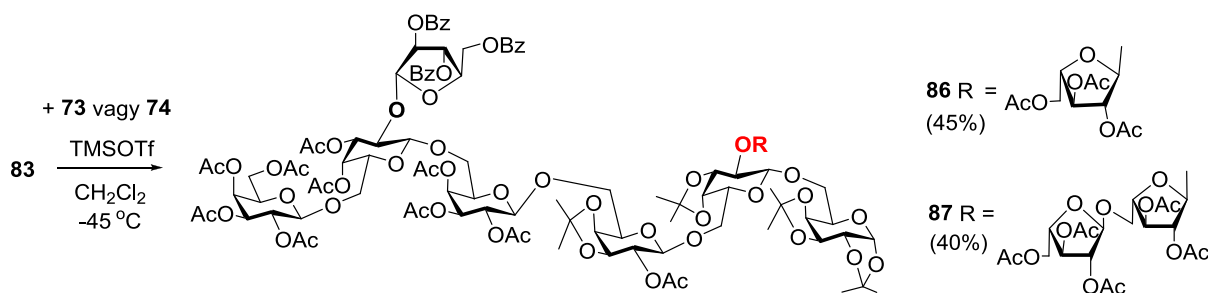
30. ábra Hexagalaktán szintézise, és az egyik arabinózilezési pont szelektív felszabadítása

Az így nyert **81** akceptort monoarabinozil (**73**) és diarabinozil donorral (**74**) is glikozileztük. A két teljesen védett arabinogalaktán származékról (**82**, **83**) katalitikus hidrogénezéssel eltávolítottuk a 2'-*O*-benzil védőcsoportot, így felszabadult a második láncelágazási pont (31. ábra).



31. ábra. A **81** hexagalaktán arabinozilezése, és a második láncelágazási pont felszabadítása

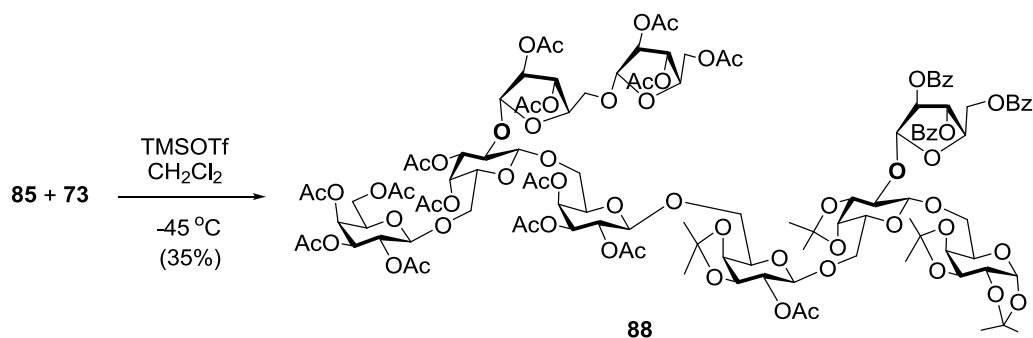
A **83** heptaszacharidot először monoarabinozil donorral reagáltattuk, így megkaptuk a **86** oktaszacharidot. Ezt követően diarabinozil donorral is kapcsoltuk a heptaszacharid akceptort, és elfogadható hozammal izoláltuk a **87** nonaszacharidot (32. ábra).



32. ábra Két láncelágazást tartalmazó arabinogalaktánok szintézise

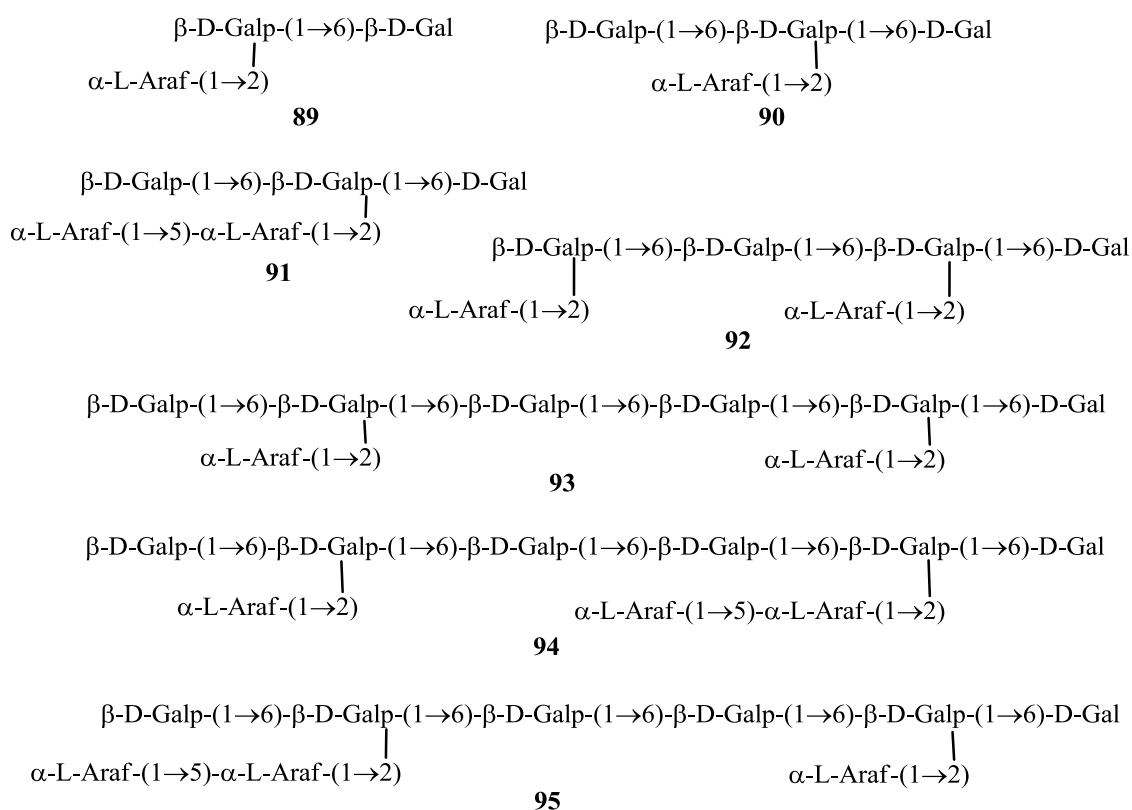
Végül előállítottuk a **87** vegyület regioizomer származékát a **85** oktaszacharid akceptorból. A **73** arabinofuranosil-imidát donorral végrehajtott glikozilezés elfogadható hozammal eredményezte az újabb, **88** nonaszacharidot.





33. ábra Mono- és diarabinozil elágazást tartalmazó nonaszacharid szintézise

Az összes, előállított arabinogalaktán származékunk acetil és izopropilidén-acetál védőcsoportokat tartalmazott, ezért minden esetben ugyanazzal a kétlépéses eljárással jutottunk el a szabad célvegyületekhez. Először Zemplén szerint eltávolítottuk az észtercsoportokat, majd az izopropilidén-csoportok savas hidrolízisét végeztük el, és így az alábbi hét arabinogalaktán oligoszacharidot nyertük:

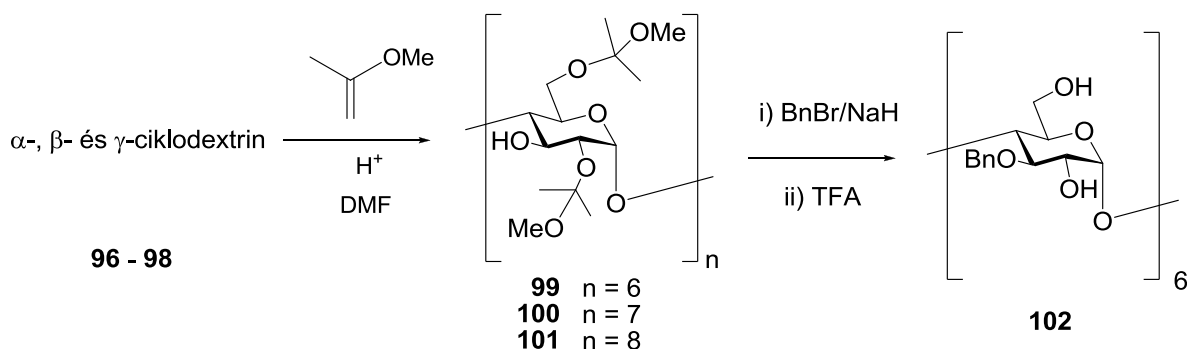


34. ábra. Az általunk szintetizált szabad arabinogalaktánok szerkezete

### 3.4.4. Az arabinogalaktánok biológiai vizsgálata. A vegyes acetál védőcsoport hasznosítása ciklodextrineken

Az előállított oligoszacharidsorozat vizsgálatát a KieLi Egyetem Gyógyszerészi Biológia Intézetében végezték el.<sup>85</sup> A kutatás célja az volt, hogy az *Echinacea purpurea* préslevéből izolált arabinogalaktán-protein (AGP) frakció ellen egerekben termelődött monoklonális antitesteknél meghatározzák az antigén epitópot, vagyis azt a minimális szénhidrát szakaszt, ami ellen a specifikus antitest termelődött. Ehhez különböző ismert szerkezetű arabinogalaktánok mint potenciális antigének és az antitestek kötődését mérték kompetitív ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tesztben, az *E. purpurea* préslevéből izolált AGP koncentráció függvényében. Az általunk előállított arabinogalaktánok közül egyedül a két monoarabinofuranozil elágazást tartalmazó tetragalaktán (**92**) mutatott gyenge reaktivitást, a többi származék inaktív volt. Az eredmények alapján az immunológusok azt valószínűsítik, hogy az *E. purpurea* immunogén oligoszacharidjának epitópja (1-6)-kötésű galaktán alapvázat tartalmaz, amelynek minden második egységéhez csatlakozik arabinofuranóz, ám az elágazási pont a galaktóz 3-as hidroxilja.<sup>85</sup> A feltételezés igazolására kutatócsoportunknál elkezdődött a 3,6-elágazású arabinogalaktánok szintézise.<sup>86</sup>

Az arabinogalaktán oligoszacharidok szintéziséhez kidolgozott (metoxidimetil)metil (MIP) vegyes acetál védőcsoportstratégiát ciklodextrineken is alkalmaztuk. A 2,2-dimetoxi-propános módszer oldékonysági problémák miatt nem volt eredményes, a reaktív 2-metoxi-propénnel viszont jó hozammal sikerült előállítanunk az  $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -ciklodextrin hexa-, hepta- és oktakisz[2,6-di-*O*-(metoxidimetil)metil] acetáljait (**99-101**).<sup>87</sup> Az  $\alpha$ -ciklodextrin hexakisz-(2,6-di-*O*-MIP) származékából (**99**) benzilezés és savas hidrolízis után hexakisz(3-*O*-benzil)- $\alpha$ -ciklodextrint nyertünk (**102**, 35. ábra).<sup>88</sup>



35. ábra. Ciklodextrinek [2,6-di-*O*-(metoxidimetil)metil]-származékainak szintézise, és a hexakisz(3-*O*-benzil)- $\alpha$ -ciklodextrin előállítása

Ismeretes, hogy a ciklodextrinek parciális szubsztitúciója általában nem egységes, hanem random módon szubsztituált termékeket eredményez ezért az általunk kifejlesztett

módszernek nagy gyakorlati jelentősége lehet, mivel alkalmas nagytisztaságú 3-szubsztituált és 2,6-diszubsztituált ciklodextrinek szintézisére.

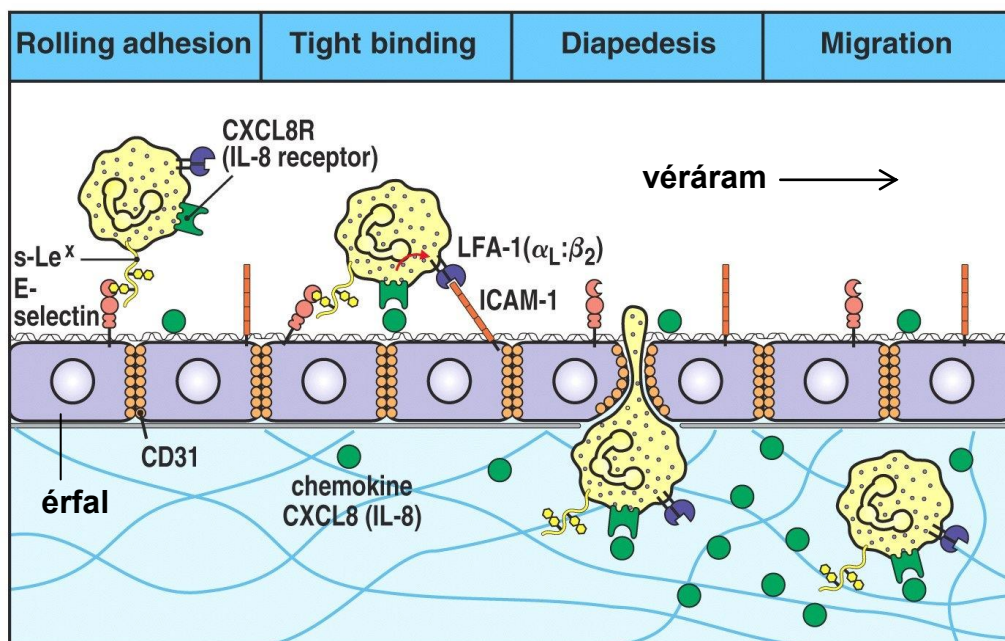
## 4. Sziálsav-tartalmú lektin ligandumok szulfonsav mimetikumainak szintézise

### 4.1. A szelektív lektinek és a szialil Lewis X szerepe a gyulladásos folyamatokban

Sérülés, fertőzés vagy testidegen anyagok szervezetbe jutása esetén a vérkeringésből leukociták áramlanak ki a sérült vagy fertőzött szövetekbe. A bonyolult, egymásra épülő adhéziós és litikus lépések láncolatából álló, gyulladásos vagy inflammációs kaszkádként ismert folyamat az immunrendszer egyik fontos védekezési mechanizmusa.<sup>89-91</sup> Nagyon komoly akut és krónikus betegségeket eredményez azonban, ha a szervezet túlzott mértékben gyűjti össze és juttatja ki a leukocitákat a véráramból. Ez a folyamat felelős olyan idült gyulladásos betegségekért, mint az övsömör vagy a reumás ízületi gyulladások, valamint olyan heveny kórképekért, mint a szélütés, valamint az infarktusok vagy műtétek után fellépő reperfüziós sérülés.<sup>92</sup> A véráramba bekerülő rákos sejtek a gyulladásos folyamat adhéziós lépéseit kihasználva képesek áttétek kialakítására.<sup>93</sup> Éppen ezért rendkívül fontos olyan módszerek kidolgozása, amelyekkel szükség esetén kontrollálható az inflammációs kaszkád, és megelőzhető, hogy a fehérvérsejtek toborzása és a véredényből való kijutása (extravazációjára) túlzott méreteket öltson.

A leukociták összegyűjtésében és extravazációjában nagyon fontos szerepet játszanak a lektinek (=szénhidrátkötő fehérjék) egy csoportját alkotó szelektinek (szelektív lektinek).<sup>94,95</sup> A szelektinek családját három, kalcium-függő transzmembrán glikoprotein alkotja. A P-szelektin az endotél sejtekben és a vérlemezkékben (plateletekben) tárolódik és biológiai jelzőmolekulák (citokinek) hatására percekben belül a sejtfelületre transzportálódik. Az E-szelektin az inflammációs stimulus után néhány órával jelenik meg az érfal belső felszínén (endotélium). Az L-szelektinek állandóan jelen vannak a leukociták felületén. A gyulladásos kaszkád első lépéseként a sérült, vagy kórokozó által megtámadott szövet citokineket küld az endotéliumhoz, és ennek hatására az érfal belső felületén E- és P-szelektinek jelennek meg. A véráramban szabadon mozgó leukociták felületén szénhidráttartalmú E- és P-szelektin-ligandumok találhatók. Az endotél felületen megjelenő szelektinek és a leukociták felületén lévő szénhidrát ligandumok között kölcsönhatás alakul ki, és ugyanilyen adhézió történik a leukociták felületén állandóan ott lévő L-szelektinek és az endotéliumon megtalálható glikoprotein ligandumok között. A szelektin-ligandum kölcsönhatások következtében a leukociták szabad mozgása megszűnik és lassan gördülni kezdenek az érfalon (rolling). Ezt

követően a szénhidrát-fehérje adhéziónál erősebb fehérje-fehérje kölcsönhatás alakul ki a leukociták felületén lévő integrinek és az érfal ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) proteinjei között. A következő lépés egy enzimatiszus fehérjebontás: egy metalloproteáz enzim lehasítja az L-szelektineket a leukociták felületéről. (A szabad L-szelektinek szerepe nem ismert.) Végül a leukociták kilépnek a véráramból (extravazáció vagy diapedesis) majd felhalmozódnak a sérülés helyén (36. ábra).<sup>89</sup>

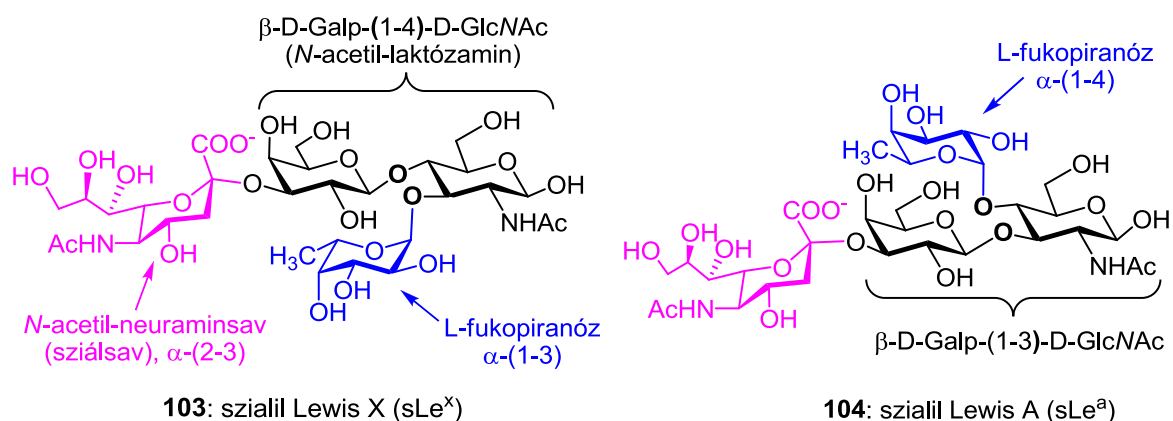


36. ábra. A fehérvérsejtek extravazációja. Forrás: <http://www.bio.davidson.edu>

A szelektinek nagyon hasonló szerkezetűek, mindhárom típust az alábbi öt alegység (domén) építi fel: egy citoszolba merülő farokrész, egy transzmembrán egység, egy változó számú ismétlődő egységből álló rész, egy epidermális növekedési faktor egység (EGF), valamint egy *N*-terminális, kalcium-függő, szénhidrátfelismerő egység (CRD: Carbohydrate Recognition Domain, ezt lektin-doménnek is nevezik).<sup>94c</sup> A szénhidrátligandum megkötéséhez a két utóbbi egység szükséges, a kötőhely a CRD részen van, de a domén megfelelő konformációját az epidermális növekedési faktor rész biztosítja.

A szelektinek legfontosabb fiziológiás ligandumai sejt felszíni glikoproteinek vagy glikolipidek. Az E- és P-szelektin ligandumai a leukocitákon találhatók (PSGL-1: P-szelektin glikoprotein ligandum, ESL-1: E-szelektin ligandum), az L-szelektin ligandumok pedig az endotél sejteken vannak (GlyCam-1: glikozilezés-függő sejtadhéziós molekula). A szelektinek a glikokonjugátumok szénhidrát részét ismerik fel. A 90-es évek elején ismertté vált, hogy a szialil Lewis X tetraszacharid (sLe<sup>x</sup>, **103**) az a minimális szénhidrát egység, amelyet

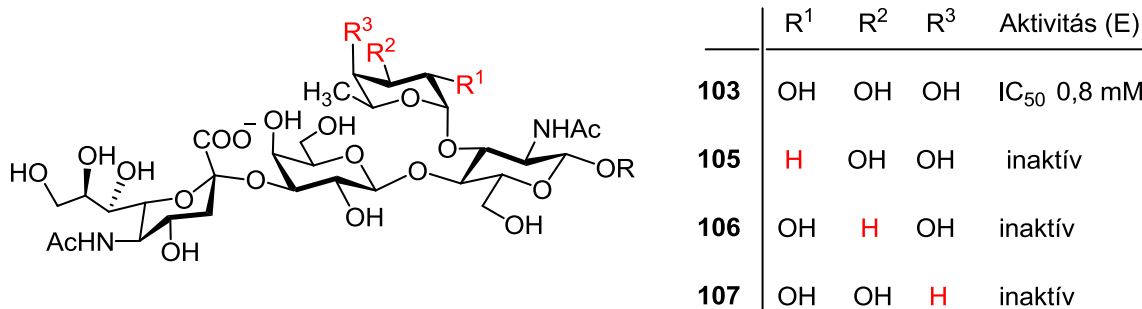
mindhárom szelektin felismer. Habár később a szelektinek számos egyéb ligandumát is azonosították (pl. szialil Lewis<sup>a</sup> (**104**), szulfatált triszacharidok, szulfatid, heparin), a szelektin-antagonisták tervezésének vezérmolekulájává a szialil Lewis<sup>x</sup> tetraszacharid vált. Ezt nemcsak korai azonosítása indokolta, hanem az is, hogy az oldható sLe<sup>x</sup> gátolta a szelektinek kötődését *in vitro*, sőt inflammációs betegségeknél is kedvező hatást mutatott.



37. ábra. A szialil Lewis X (**103**) és a szialil Lewis A (**104**) szerkezete

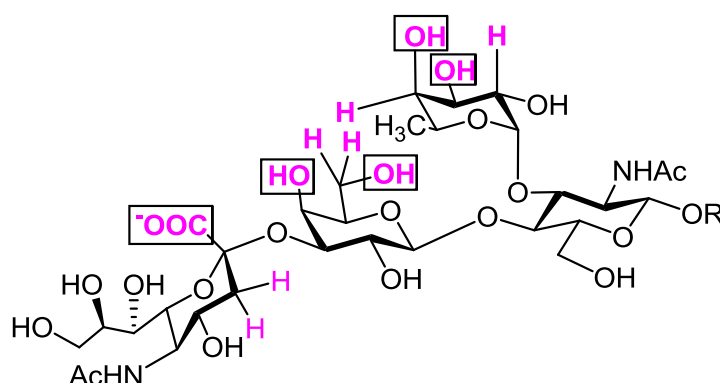
#### 4.2. A szialil Lewis X hatás-szerkezet összefüggéseinek felderítése

A 90-es évek elején intenzív kutatások kezdődtek szénhidrát-alapú gyulladásgátló és antimetasztatikus terápia kidolgozására. Az aktív mimetikumok tervezésének előfeltétele volt a szialil Lewis X vezérmolekula farmakofór csoportokjainak azonosítása, és bioaktív konformációjának meghatározása. A Hasegawa<sup>96</sup> és a Gaeta-csoport<sup>97</sup> számos módosított mimetikumot állított elő a kötődéshez nélkülözhetetlen csoportok meghatározása céljából. Szisztematikusan, egyesével hidrogénre cserélték a szialil Lewis X valamennyi hidroxilcsoportját, a fukóz metilcsoportját és a szialsav karboxilját, majd megvizsgálták az így előállított analagonok kötődését a szelektinekhez. (A fukóz egységen végzett módosítások hatását mutatja a 38. ábra).



38. ábra. A fukóz-egység farmakofór csoportjainak meghatározása szintetikus módosításokkal

Vizsgálataik szerint a kötődéshez nélkülözhetetlen az *N*-acetyl-neuraminsav karboxilcsoportja, valamint négy hidroxilcsoport: a fukóz 3-as és 4-es, valamint a galaktóz 4-es és 6-os hidroxilja. (Farmakofór csoportnak vélték E- és L-szelektin esetén a fukóz 2-OH csoportját is, de ezt a későbbi vizsgálatok nem erősítették meg.) Az *N*-acetyl-glükózamin hidroxiljai nem alakítanak ki kötést a fehérjével, ugyanakkor a glükózamin résznek fontos szerepe van a molekula megfelelő téralkatának biztosításában.



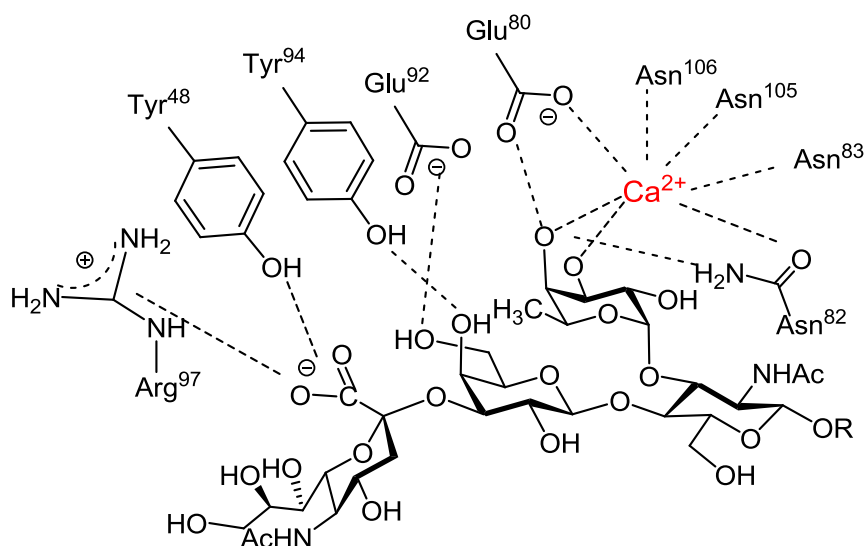
39. ábra. A szialil Lewis X tetraszacharid farmakofór csoportjai

Telítési transzfer differencia NMR mérésekkel (STD-NMR) határozták meg, hogy a tetraszacharid mely protonjai kötődnek a fehérjéhez.<sup>98</sup> A fukóz egység 2-es és 4-es hidrogénje, valamint a galaktóz 6-os hidrogénjei szorosan, az *NAc*-neuraminsav 3-as helyzetű hidrogénjei pedig lazán kapcsolódnak a kötőhelyhez (39. ábra).

A bioaktív konformációt szintén NMR módszerekkel határozták meg oly módon, hogy az oldatban lévő sLe<sup>x</sup> NOE jeleit és a szelektinhez kötött sLe<sup>x</sup> transzfer NOE jeleit összehasonlították.<sup>99-102</sup> Megállapították, hogy a szelektinekhez kötött aktív konformáció és a szabad sLe<sup>x</sup> oldatbeli konformációja csak az *NAc*-neuraminsav orientációjában különbözik.

A humán P- és E-szelektin EGF-lektin-doménjének a szialil Lewis<sup>x</sup>-szel alkotott komplexét röntgen-diffrakciós módszerekkel is vizsgálták, és a 2000-ben publikált

eredmények<sup>103</sup> sok részlettel pontosították ismereteinket. Meglepő információ volt, hogy a kötések nagy részben elektrosztatikus természetűek. A kristályszerkezet jól mutatja, hogy a tetraszacharid kis felületen (körülbelül  $550\text{\AA}^2$ ) érintkezik a fehérjével, továbbá, hogy a kalcium a fukóz 3-as és 4-es hidroxiljával van kötésben, és a kalcium koordinációs szférája négy aminosavat tartalmaz (40. ábra).



40. ábra. A szialil Lewis X kötődése az E szelektinhez

#### 4.3. Szialil Lewis X mimetikumok szintézise - irodalmi áttekintés

A szerkezeti követelmények felderítése után nagyon komoly kutatói kapacitás mozdult meg abból a célból, hogy megfelelő szelektin antagonistákat találjanak, amelyek felhasználhatók akut és krónikus gyulladások gyógyítására, valamint a rákos sejtek metasztatikus folyamatainak megakadályozására.

A gyógyszertervezés kezdeti fázisában a fiziológias ligandumok szénhidrát részeit alkalmazták potenciális gyulladásgátló szerként. A minimális ligandumszerkezetként azonosított szialil Lewis X tetraszacharid első szintézisét Hasegawa valósította meg 1991-ben, tioglikozid építőelemek és dimetil(metiltio)szulfónium-triflát (DMTST) aktivátor alkalmazásával.<sup>104</sup> Hamarosan a Nicolaou csoport<sup>105</sup> is közölt egy szintézist: a Lewis X triszacharidot glikozil-fluoridokból építették fel, majd szialil-kloriddal glikozilezték; a glikozidos kötés  $\alpha$ -térállását a szialinsav-donor anomer centrumának szomszédságában elhelyezett feniltio-szubsztituenssel biztosították. 1995-ben a Danishefsky-laboratóriumban is előállították a tetraszacharidot,<sup>106</sup> szintézisük újdonsága az volt, hogy a glükózamin részt



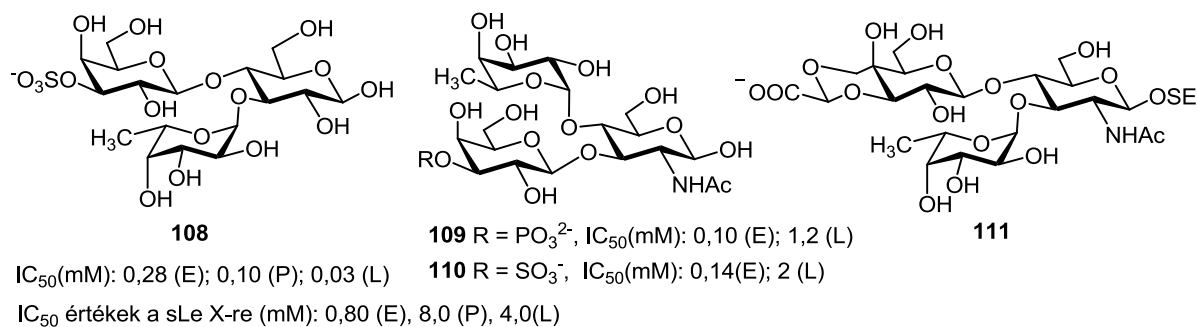
glükál prekursoron keresztül azaglikozilezéssel állították elő. A kémiai szintéziseket követően multi-enzimátikus módszerrel is sikeresen állították elő szialil Lewis X-tartalmú glikopeptidet, milligrammos mennyiségben.<sup>107</sup>

A természetes szénhidrát-ligandumok közül egy sLe<sup>x</sup>-pentaszacharid (Cylexin) különböző reperfüziós sérülések kezelésében nagyon kedvező biológiai hatásokat mutatott, és tesztelése a klinikai III. fázisig jutott, ám végül csekély biológiai affinitása és elérhetősége miatt nem lett gyógyszer. Mindazonáltal a kezdeti sikerek bebizonyították, hogy a szialil Lewis X jó vezérmolekula, és nagyon intenzív kutatások kezdődtek „gyógyszer-szerűbb” mimetikumok tervezésére.<sup>89</sup> (A szénhidrátok nem ideális gyógyszerjelöltek, mivel szintézisük nehéz, gyengén kötődnek, és labilis glikozidos kötéseik miatt az orális adagolás általában nem oldható meg.)

A kötődés szerkezeti feltételeinek, az aktív konformációnak és a farmakofőr csoportoknak az ismeretében valószínűsítették, hogy az sLe<sup>x</sup> szerkezet jelentősen egyszerűsíthető. Ezt a feltételezést erősítették azok a kutatások, amelyek újabb szelektin receptorokat azonosítottak. Kiderült, hogy az L-szelektineknek természetes ligandumai a szulfátészter-tartalmú Lewis triszacharidok is (Le<sup>x</sup>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Le<sup>a</sup>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). A P- és L-szelektinek esetében olyan ligandumokat is azonosítottak, amelyek szénhidrátként csak egy szulfátált vagy foszfátált monoszacharid egységet tartalmaznak. A legfőbb kutatási irány a szialil Lewis X szerkezet leegyszerűsítése, könnyebben és olcsón előállítható, kisméretű molekulák szintézise volt, amelyek a természetes ligandumnál erősebb kötődési affinitást és specificitást mutatnak.

#### 4.3.1. Az *N*-acetylneuraminsav rész helyettesítése

A szerkezet egyszerűsítése először a szialsav helyettesítésével történt, hiszen ismert volt, hogy ennek az egységnek csak a karboxilcsoportja vesz részt a kötődésben. Az *N*Ac-neuraminsav helyettesítőjeként szulfát- és foszfátésztert, valamint egyszerű karbonsav-részleteket alakítottak ki a galaktóz 3-as helyzetében (41. ábra). A **108** szulfátált Lewis X nagy affinitással kötődött mindhárom szelektinhez,<sup>108</sup> a Lewis A triszacharid 3'-foszfát (**109**) és 3'-szulfát (**110**) származéka viszont csak az E-szelektinnel szemben mutatott aktivitást.<sup>109</sup>



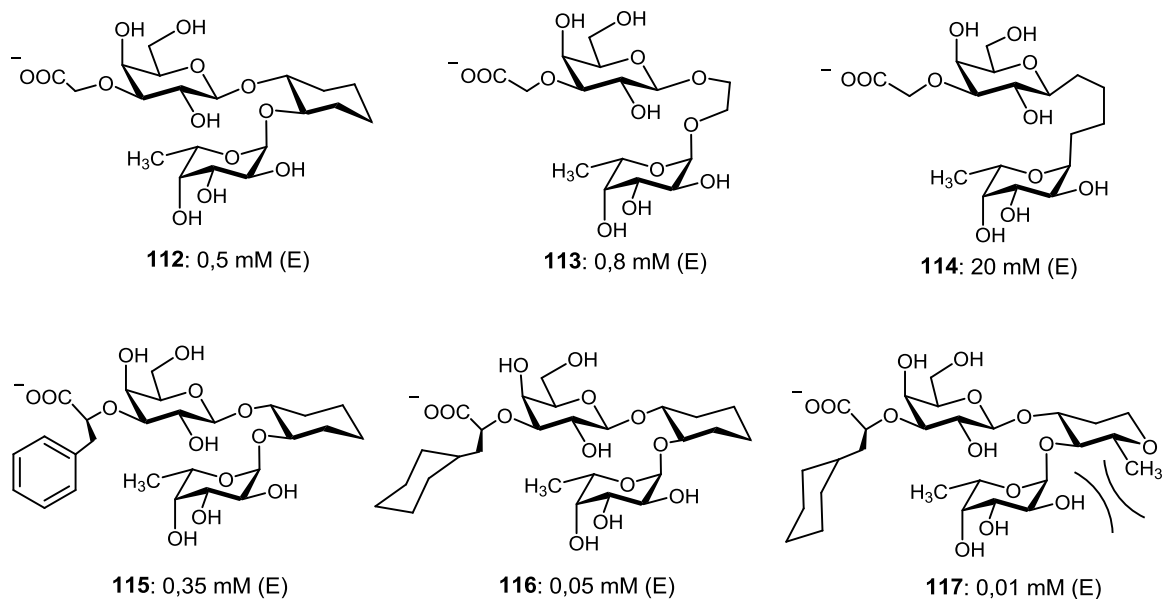
41. ábra. A szialsav helyettesítése: Lewis triszacharid alapú analogonok

A karbonsav analogonok szintézise során az *N*-acetyl-neuraminsavat glikolsavval, vagy tejsav-származékkal helyettesítették („-CHRCOO<sup>-</sup>”, egység beépítése). Ez a módosítás nagyon jó kötési tulajdonságú vegyületeket eredményezett, amennyiben a karboxilcsoport térhelyezete megfelelő volt. A **111** vegyület viszont inaktívnak bizonyult,<sup>110</sup> mivel a gyűrűs szerkezettel rossz térhelyzetben rögzített karboxilcsoport nem képes a megfelelő bioaktív orientációba kerülni.

#### 4.3.2. A szialsav és az *N*-acetylglükózamin rész helyettesítése

A szialsav mellett a glükózamin helyettesítése is kézenfekvőnek tűnt, mivel ennek az építőelemnek egyetlen funkciós csoportja sem létesít kötést a szelektinekkal, csak az a feladata, hogy megfelelő térhelyzetben tartsa a farmakofór csoportokat tartalmazó fukóz és a galaktóz egységet. Az 1,2-*transz*-ciklohexán-diol, amely rigiditásban és alakban is nagyon hasonlít a piranóz gyűrűre, a várakozásoknak megfelelően jó helyettesítőnek bizonyult (**112**, **115-117**).<sup>89,108,111</sup> Meglepő módon az etándiol csaknem ugyanilyen hatékonyan helyettesítette a glükózamin egységet (**113**), a karba-analógok (**114**) kötési affinitása viszont jóval gyengébbnek bizonyult (42. ábra).<sup>89,112</sup>

Ebből a típusból az (*S*)-ciklohexil-tejsav (**116**, **117**)<sup>112,113</sup> származékok voltak a leghatékonyabbak. A **117** származék<sup>114</sup> flexibilitását térbeli gátlás révén, egy metilcsoport beépítésével lecsökkentették, ami jelentősen megnövelte a hatékonyságot. A molekula merev konformációja valószínűleg nagyon megközelíti a természetes ligandum aktív konformációját.



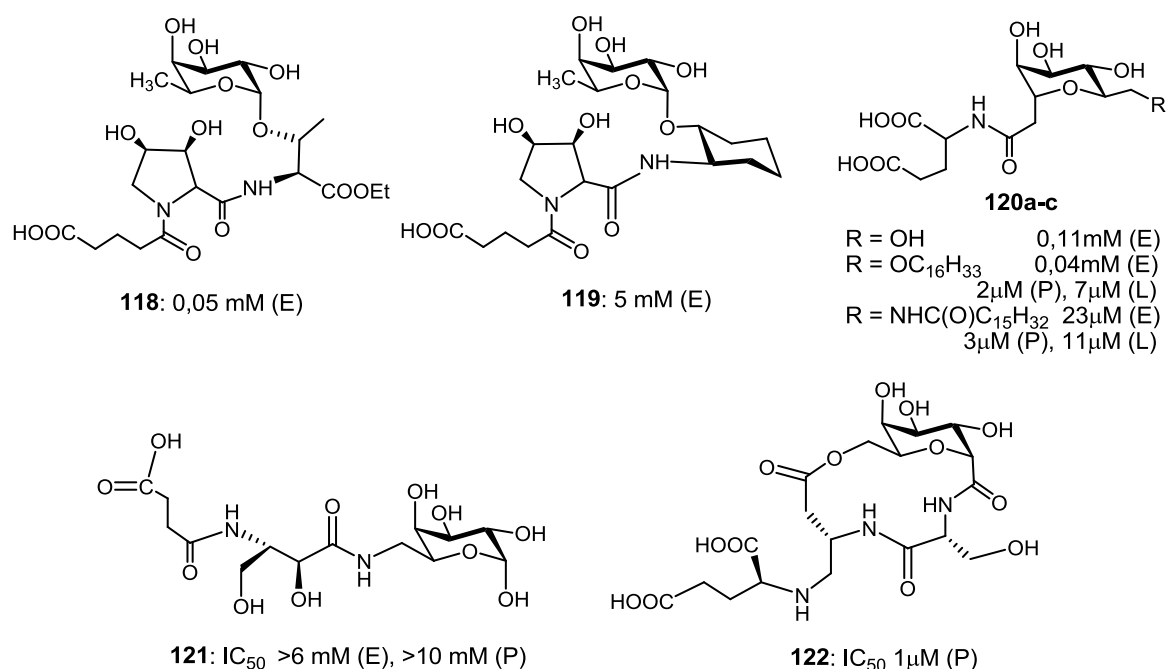
42. ábra. Pszeudo-triszacharid mimetikumok

#### 4.3.3. Egyetlen cukoregységet tartalmazó mimetikumok

A szénhidrát váz további egyszerűsítését a teljes laktózamin rész elhagyása jelentette, így olyan analagonokat nyertek, amelyek az eredeti tetraszacharidból kizárólag a fukózt – vagy annak szénhidrát-helyettesítőt – tartalmazták. A vegyülettípus első képviselői a Wong által előállított fukopeptidek, amelyekben a Galp- $\beta$ -(1-4)-GlcNAc egységet a fukózhhoz kötött peptid helyettesíti (43. ábra).<sup>89</sup> A **118** és **119** vegyület példáján látható, milyen nehéz kiszámítani a helyettesítések hatását. A jó aktivitást mutató **118** vegyületben treoninnal helyettesítették a glükózamin egységet; ezt a molekulát kívánták továbbfejleszteni a GlcNAc egységhez sokkal hasonlóbb aminociklohexanol beépítésével, ám a módosítás a várakozásokkal ellentétben nem javította, hanem jelentősen rontotta az aktivitást.

A fukopeptidek kedvező eredményei után újabb glikopeptid sorozatot állítottak elő, amelyekben a fukózt D-mannózzal (**120**) vagy L-galaktózzal (**121**, **122**) helyettesítették. Ezek a cukoregységek ugyanolyan térállásban tartalmazzák a hidroxilokat, mint az L-fukóz, de annál lényegesen olcsóbbak. A mannóz-tartalmú analógok a fukopeptidekhez hasonló kötődési affinitást mutattak.<sup>115,116</sup> Kiemelkedően jó aktivitást mutattak a 6-os helyzetben alkoxi-csoportot vagy acilezett amint tartalmazó analógok (**120b**, **c**), az erősebb kötődést valószínűleg hidrofób hatás eredményezte. Számítógépes tervezés alapján állították elő a **121** mimetikumot, a 6-dezoxi-6-amino-L-galaktózból.<sup>117</sup> A molekuladinamikai számítások alapján a vegyület legalacsonyabb energiájú konformációjában a farmakofór csoportok térbeli elrendeződése pontosan megegyezik az E-szelektinhez kötött sLe<sup>x</sup> bioaktív konformációjával.

Ennek ellenére a vegyület P-szelektinnel szemben inaktív volt, és E-szelektin affinitása is kicsinek bizonyult. A csekély aktivitást a nagy konformációs flexibilitással magyarázták.

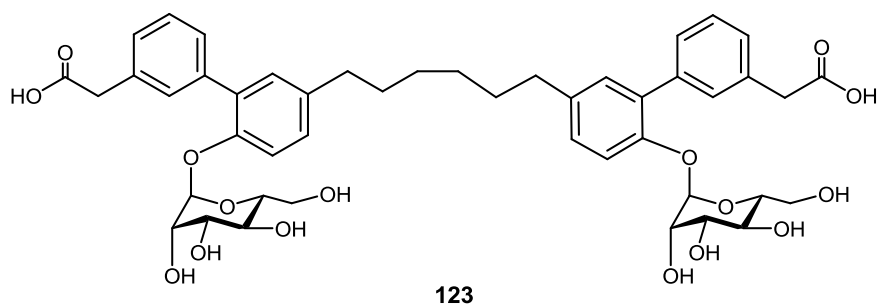


43. ábra. Glikopeptid mimetikumok (L-fukóz, D-mannóz és L-galaktóz származékok)

Ennek a vegyületcsaládnak a leghatékonyabb képviselőjét a Wong csoport által előállított **122**<sup>118</sup> rigid makrociklikus, amely tartalmazza a szialil Lewis<sup>x</sup> valamennyi farmakofór csoportját a bioaktív konformációnak megfelelően rögzítve. A vegyület kb. 1000-szer erősebben kötődik P-szelektinhez, mint az sLe<sup>x</sup>.

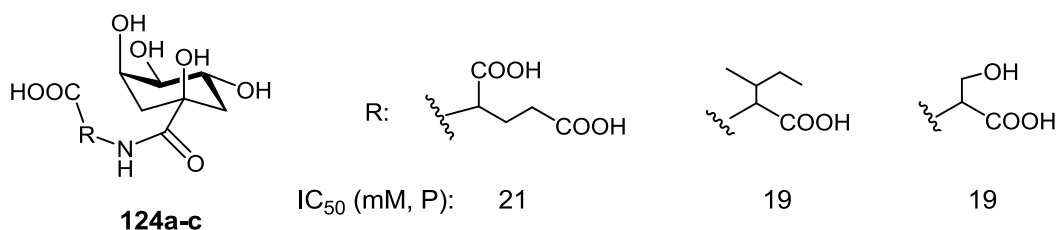
Az egyetlen cukoregységet tartalmazó mimetikumok egy újabb csoportját alkotják a Kogan és munkatársai által előállított bifenil-alapú vegyületek, amelyek a szialsav helyett karboximetil-csoportot, a laktózamin helyett bifenilt tartalmaznak, a fukóz egységet pedig D-mannóz helyettesíti. Ezek a származékok azonban a szialil Lewis<sup>x</sup>-nél gyengébb kötődési tulajdonságokat mutattak.<sup>89</sup> Ugyanakkor a **123** bivalens molekula (44. ábra) mindhárom szelektinhez jól kötődik, de különösen a P-szelektin-inhibitor hatása kiemelkedő (IC<sub>50</sub> 0,015mmol).<sup>119</sup> A vegyület *in vivo* modellekben is nagyon jó hatást mutatott allergiás asztma és reperfüziós sérülések kezelésében.<sup>120</sup>

dc\_228\_11



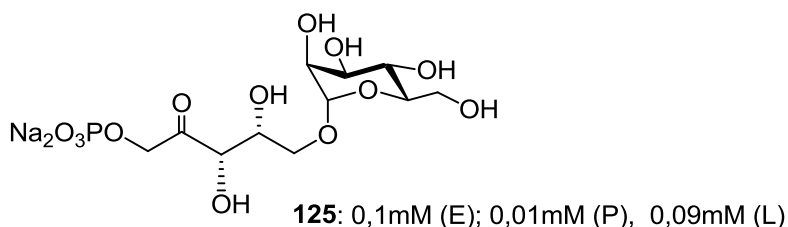
44. ábra. Bifenil-alapú bivalens mimetikum

A glikopeptidhez hasonló szerkezetű, de nem cukoralapú szialil Lewis<sup>x</sup> mimetikumokat állítottak elő francia kutatók (**124**). A fukóz egység helyettesítésére kinasavat használtak, amelynek hidroxilcsoportjai megfelelő térbeli elrendeződésűek. A karboxilcsoportot aminosav lánc formájában kapcsolták a kinasavhoz (45. ábra).<sup>121</sup> Az analogonok gyenge aktivitását valószínűleg konformációs flexibilitás és a galaktóz farmakofór hidroxiljainak elhagyása okozta.



45. ábra. Kinasav-alapú mimetikumok

A **125** vegyületben is D-mannóz helyettesíti a fukóz egységet, a szialinsav rész karboxilcsoportját pedig foszfátészterrel helyettesítették (46. ábra).<sup>116</sup> A kiemelkedő aktivitás egyrészt a foszfátcsoport és a szelektin egy közeli lizin egysége között kialakuló erős kölcsönhatásnak köszönhető, másrészt az aglikon két OH-csoportja valószínűleg jól helyettesíti a galaktóz farmakofór hidroxiljait.

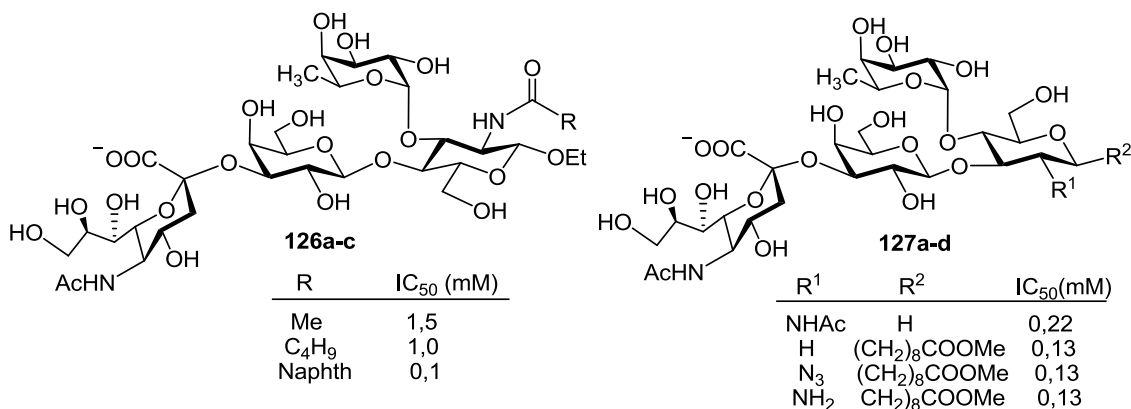


46. ábra. D-Mannóz alapú mimetikum

#### 4.3.4. Újabb funkciós csoportok bevitele

Az eddig ismertetett mimetikumokban csökkentették a labilis glikozidos kötések számát, és igyekeztek a lehető legnagyobb mértékben leegyszerűsíteni a vezérmolekulaként szolgáló tetraszacharidot. Az egyszerűsítés mellett egy új irány is megjelent: a természetes ligandumokat ( $sLe^x$ ,  $sLe^a$ ) újabb funkciós csoportok bevitelével módosították. Azt várták, hogy ezek a csoportok új kötések létrehozásával növelik a kötési affinitást, és így hatásosabban képesek gátolni a szelektineket.

Általában az *N*-acetyl-glükózamin egységen építettek be új funkciós csoportokat: vagy az aminocsoportot szubsztituálták (**126**), vagy apoláros láncot kapcsoltak a nemredukáló véghez (**127**). (Az apoláros lánc kedvező hatása a **120** glikopeptid mimetikumnál is megmutatkozott.) Hayashi és munkatársai vizsgálatai azt mutatták, hogy az *N*-naftoil csoport bevitelével (**126c**) a kötési affinitás legalább 10-szeresére növekedett az  $sLe^x$ -hez képest.<sup>122</sup> Nelson és munkatársai megállapították, hogy a szialil Lewis<sup>a</sup> *N*-acetyl csoportja hatékonyan helyettesíthető aziddal, aminnal vagy akár hidrogénnel is (**127a-d**); jól látható a hidrofób aglikon (8-metoxikarboniloktil) affinitásnövelő hatása is.<sup>123</sup>



47. ábra. A glükózamin egységen módosított  $sLe^x$  (**126**) és  $sLe^a$  (**127**) mimetikumok

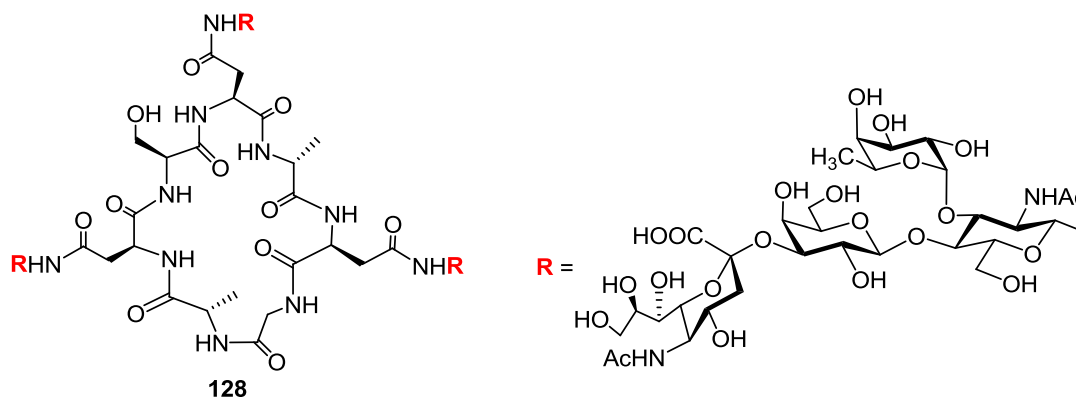
#### 4.3.5. Glikoklaszterek, multivalens származékok

Az eddig tárgyalt mimetikumok közül sok származék mutatott a természetes ligandumoknál nagyobb szelektin-affinitást, a legjobbak 0,1-0,01 mM koncentrációban eredményeztek 50%-os gátlást. Ugyanakkor a kis molekulatömegű  $sLe^x$  származékok egyensúlyi körülmények között csak gyengén kötődnek a szelektinekhez.

Több kutatócsoport is törekedett arra, hogy polivalens mimetikumokat állítson elő, és a polivalencia hatás révén növelje a kötődés erősségét. A poli- vagy multivalencia hatás azt jelenti, hogy ha az aktív szerkezetet egy molekulán belül megsokszorozzuk, akkor az aktív

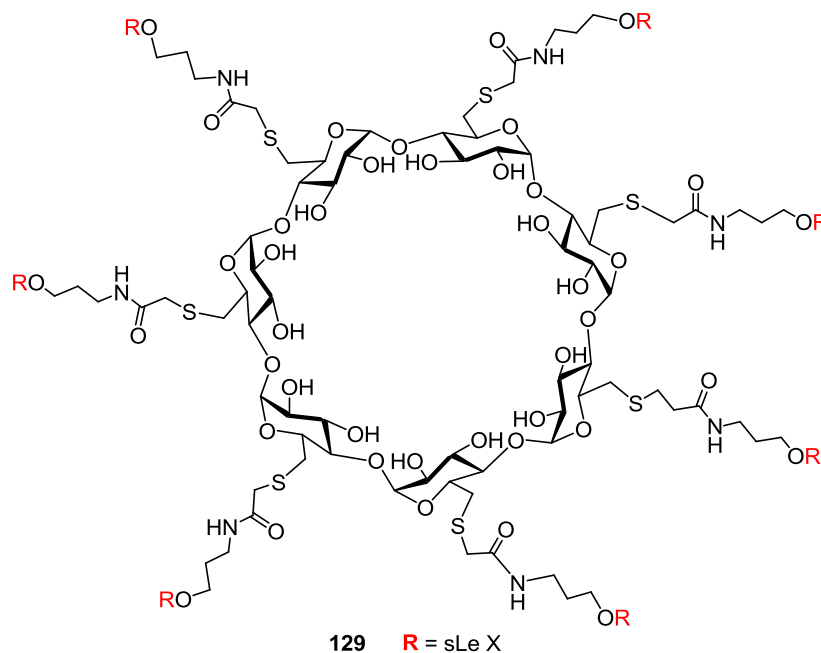
csoportok számával nem egyenesen arányosan, hanem annál sokkal nagyobb mértékben növekszik az aktivitás.<sup>124</sup> Az első polivalens molekulák liposzóma származékok voltak, amelyek amid-kötéssel kapcsolódó sLe<sup>x</sup> egységeket tartalmaztak. A polimer hordozóhoz kötött származékoknak azonban nagy hátránya a heterogenitás. Ugyanakkor, ha többfunkciós központi molekulákhoz kötjük az aktív csoportokat, akkor teljesen egységes, klaszter-típusú multivalens vegyületet kapunk. Egy egyszerű bivalens klaszternek tekinthető a Kogan-féle bifeníl-alapú mimetikum (**123**).

Ciklikus-peptid alapú trivalens klaszter vegyületet állítottak elő Kunz és munkatársai (128).<sup>125</sup> A kémiai szintézissel előállított központi gyűrűs peptid karboxilcsoportjaihoz amidkötéssel kapcsolták az sLex<sup>x</sup> anomer-amin származékait. A vegyület jól gátolta HL<sub>60</sub> sejtek (sLex igandumot tartalmazó tumor sejtek) kötődését E-szelektinhez.



48. ábra Trivalens, ciklikus-peptid alapú mimetikumok

A glikoklaszterek egyik legújabb képviselője a kemoenzimatisz szintézissel előállított **129** ciklodextrinszármazék.<sup>126</sup> A szintézis kulcsintermedierjét, a hét NAc-glükózaminegységet hordozó  $\beta$ -CD származékot a heptakisz 6-dezoxi-6-jód ciklodextrin és nátrium-tiolát tartalmú GlcNAc összekapcsolásával állították elő. Ezt követően enzimatisz lánchosszabítási lépésekkel jutottak el a végtermékig. Felületi plazmonrezonancia vizsgálat szerint a vegyület nagyon jó aktivitást mutatott szenzor chipen immobilizált BSA-(sLe<sup>x</sup>)<sub>n</sub> és E-szelektin közötti kölcsönhatás gátlásában.

49. ábra  $\beta$ -Ciklodextrin-alapú heptavalens sLe X mimetikum

#### 4.4. Új típusú lektin-ligandumok szintézise - Saját eredmények<sup>127-134</sup>

##### 4.4.1. Potenciális szelektin-antagonisták előállítása 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil építőelem felhasználásával

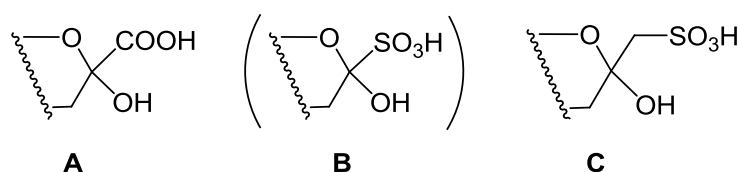
A 90-es évek végén az oligoszacharidkémia egyik legizgalmasabb, és gyógyszerkutatási szempontból a legtöbb eredménnyel kecsegtető területe volt a potenciális szelektin-antagonisták szintézise, mivel a szintetikus szialil Lewis X analogonokat gyulladásgátló terápiában alkalmazható gyógyszerjelöltként tartották számon. Kutatócsoportunk új típusú, szulfonsav-tartalmú mimetikumok előállításával járult hozzá ezekhez a kutatásokhoz.

A szelektin-sLe<sup>x</sup> kölcsönhatás vizsgálata során kiderült, hogy alapvető fontosságú a szénhidrát *N*-acetil-neuraminsav egységének karboxilcsoportja és a fehérje arginin egysége között kialakuló erős ionos kötés. A szelektineknek természetes liganduma a szulfatált Lewis X is, amely a szialsav helyén szulfátésztert tartalmaz; ennek a vegyületnek a szulfátészter-csoportja létesít sóhidat az argininnel.<sup>135</sup> Mivel a szulfonsav mind a szulfátészternél, mind a megfelelő karbonsavnál erősebb sav, ezért feltételeztük, hogy a megfelelő helyzetben szulfonsav-csoportot tartalmazó analógok is képesek megfelelő erősségű kötés kialakítására. Kutatásaink kezdetén egyetlen szénhidrát-szulfonsav, a 6-dezoxi-6-szulfonsav-D-glükóz előállítására volt néhány példa az irodalomban,<sup>136</sup> ezért a tervezett analogonok nemcsak



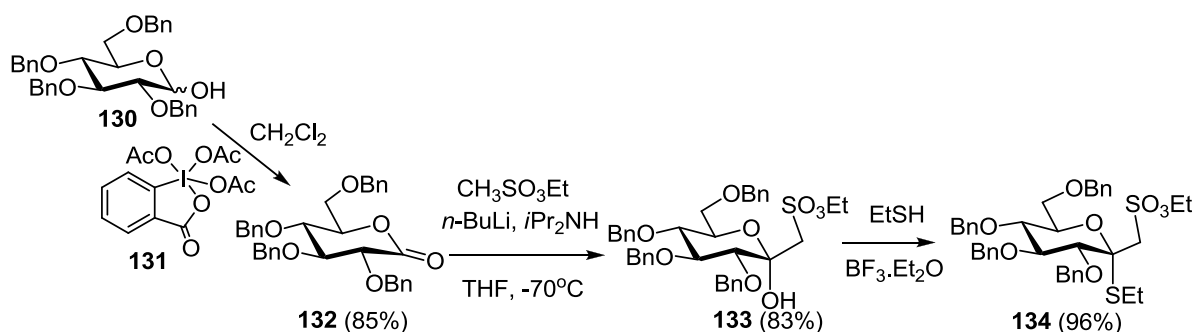
biológiai, hanem szintetikus szempontból is újdonságot jelentettek, és megfelelő szintézismódszerek kidolgozását illetve szénhidrátkémiai alkalmazását tették szükségessé.

Tervünk az volt, hogy az *N*-acetyl-neuraminsav szulfonsav analogonjaként anomer szulfonsavcsoportot tartalmazó ketózt állítunk elő, majd ezt glikozil donorként használjuk fel szialil Lewis X mimetikumok előállítására. Mivel a szíálsav, és általában a 2-ulóz-onsavak (**A**), karboxilcsoportjának közvetlen szubsztitúciója  $-\text{SO}_3\text{H}$  csoporttal egy nagyon labilis szerkezetet eredményezne (**B**), ezért a szulfonsavcsoportot egy metilénhídon keresztül kívántuk az anomer centrumhoz kapcsolni (**C**, 50. ábra). Feltételeztük, hogy a **C** szerkezet védett aldonsavlaktonból karbanion-addíciós reakcióval előállítható.



50. ábra. 2-Ulóz-onsavak szulfonsav-mimetikumának tervezése

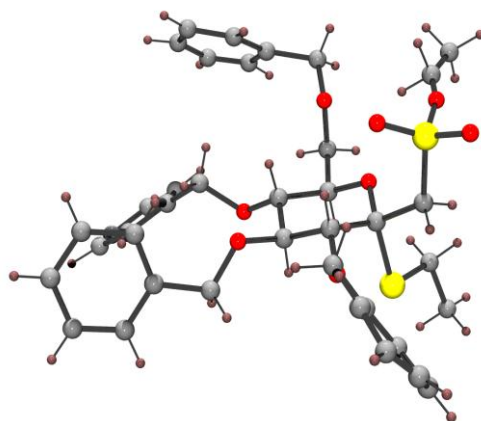
A szintézisutat a kereskedelmi forgalomban beszerezhető 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-D-glükózon (**130**) dolgoztuk ki (51. ábra). A kiindulási laktol oxidációjára több módszert kipróbáltunk (piridinium-dikromát/ecetsavanhidrid, piridinium-klór-kromát), leg-hatékonyabbnak a Dess-Martin féle perjodinános (**131**) eljárás bizonyult.<sup>137</sup> Az így előállított laktonból (**132**) etil-metánszulfonátból *in situ* generált karbanionnal sztereoszelektív módon nyertük a 3,4,5,7-tetra-*O*-benzil-1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-D-glüko-hept-2-ulopiranóz  $\alpha$ -anomerjét (**133**). A reakcióval egyetlen lépésben sikerült bevezetni az anomer pozícióba a szulfonsav-csoportot, és regenerálni a glikozidos hidroxilt, ami lehetővé tette, hogy a származékot glikozil donorrá alakítsuk. A donorképzést Lewis-sav jelenlétében etántiollal hajtottuk végre, és kiváló hozammal izoláltuk a **134** tioglikozidot.<sup>127,128</sup>



51. ábra. 1-Dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranóz származékok (**133**, **134**) szintézise

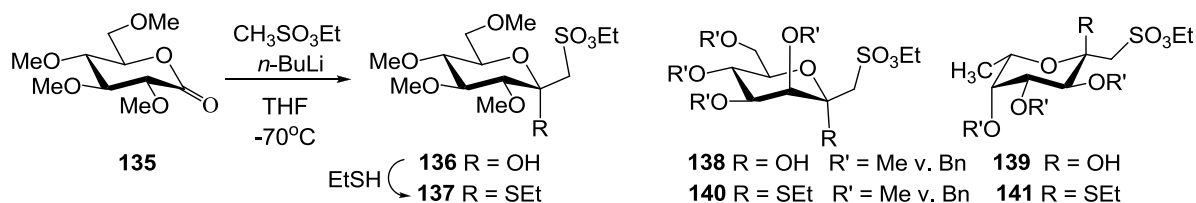
Mivel az 1-dezoxi-1-szulfonil-heptulóz származékok nem tartalmaznak protont a glikozidos szénatomon, ezért anomer konfigurációjuk meghatározása a szokásos proton-proton csatolási állandó helyett a C-1 és H-3 között három kötésen át ható csatolási állandó ( $^3J_{C1,H3}$ ) alapján történt. A proton-szén három kötésen át ható csatolási állandók a Karplus-összefüggésnek megfelelően a C<sub>1</sub> és H<sub>3</sub> torziós szögének függvényében változnak.<sup>138-140</sup> A kis csatolási állandók (**133**:  $^3J_{C1,H3}=2,1\text{Hz}$ , **134**:  $^3J_{C1,H3}=2,7\text{Hz}$ ) alapján egyértelmű volt a C1 és H3 csoportok *sin* térállása, vagyis a vegyületek  $\alpha$ -konfigurációja. (A későbbiekben részletesen megvizsgáltuk, milyen korlátokkal alkalmazhatók a  $^3J_{C1,H3}$  értékek ketozil-glikozidok szerkezetének meghatározására, ezzel kapcsolatos eredményeinket<sup>130</sup> a következő fejezetben tárgyalom.)

A tioglikozid térszerkezetét röntgenkristallográfiai vizsgálatokkal is bizonyítottuk. A röntgenszerkezet ORTEP ábrázolásán jól látszik, hogy az etiltio-csoport axiális, a szulfonátometil-csoport pedig ekvatoriális térállású (52. ábra).



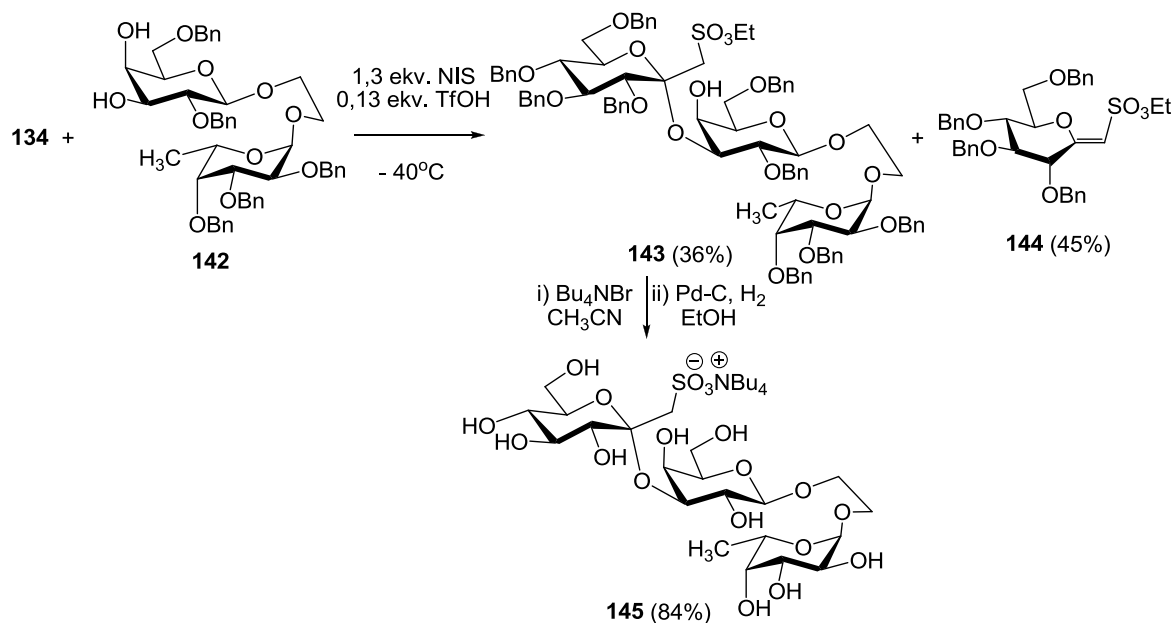
52. ábra. A **134** tioglikozid röntgendiffrakciós szerkezete

A karbanion-addíciós reakciót és a tioglikozid-képzést a metilezett glükonsav-laktonon (**135**) is elvégeztük ( $\rightarrow$ **136** $\rightarrow$ **137**), majd L-fukózból és D-mannózból is előállítottuk a perbenzilezett és permetilezett 1-dezoxi-1-szulfonáto-heptozid származékokat (**138-141**), az 51. ábrán bemutatott szintézisutat követve. A reakciók mindig sztereoszelektív módon mentek végbe, és az ekvatoriális etil-szulfonátometil-csoportot tartalmazó termékeket szolgáltatták (53. ábra). A **133**, **136**, valamint a **138** és **139** vegyületeket a biológiai szempontból rendkívül jelentős 2-ulóz-onsavak (KDO, NAc-neuraminsav, KDN)<sup>141</sup> első szulfonsav-mimetikumaiként közöltük.<sup>127,128</sup>



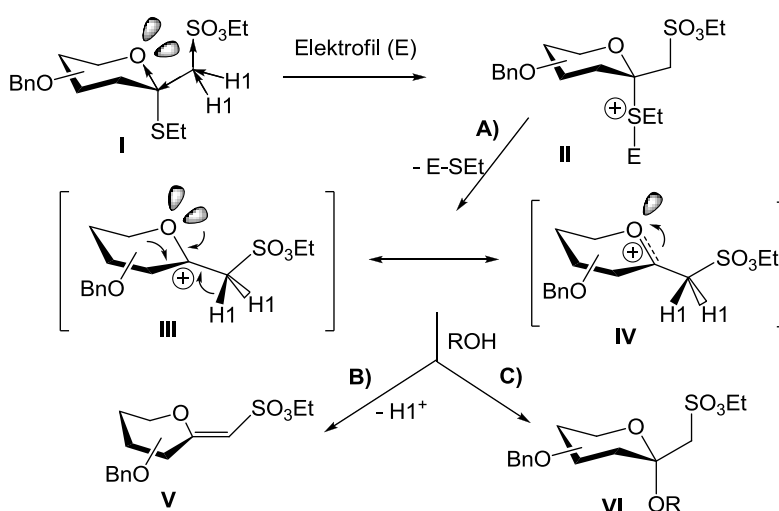
53. ábra D-Glükonsavból, D-mannonsavból és L-fukonsavból előállított ketoszulfonsavak

A továbbiakban a szulfonsav-észter csoportot tartalmazó származékok tioglikozidjait használtuk fel szialil Lewis X mimetikumok szintézisére. Az irodalmi mimetikumoknál láthattuk, hogy az *N*-acetil-glükózamin egység jól helyettesíthető etilén-glikollal. Elsőként mi is egy ilyen helyettesítést alkalmaztunk (54. ábra). Előállítottuk a Lewis X triszacharid egyszerűsített szerkezeti analogonjának tekinthető **142** pszeudo-triszacharidot, amelyben a D-galaktóz és az L-fukóz egységet etilén-glikol-híd köti össze, majd ezt a diol akceptort glikozileztük a **134** donorral. A reakció lejátszódásának feltétele volt, hogy az akceptor 4'-hidroxilja is szabad legyen; amennyiben a 4'-pozícióban benzil vagy benzoil-védőcsoport volt, a reakció nem játszódott le, mivel a nagy térigényű donor nem tudta megközelíteni a 3'-hidroxilt. A glikozilezési reakcióban a várt termék (**143**) mellett a donorból eliminációs melléktermék is képződött; a sztereokémiai egységes **144** exoglikált az NMR adatok alapján (*Z*)-izomerként azonosítottuk. A **143** pszeudo-tetraszacharid szulfonsavészter-csoportját szulfonsav-sóvá alakítottuk át tetrabutilammónium-bromiddal végrehajtott nukleofil szubsztitúciós reakcióban, majd katalitikus hidrogénezéssel jutottunk el a végtermékhez. Nagyon fontos volt, hogy ilyen sorrendben történjék a védőcsoportok eltávolítása, mivel modell-reakciókban azt tapasztaltuk, hogy a szulfonsav-etilészterből katalitikus hidrogénezéssel szulfonsav képződik, és az erős sav a glikozidos kötések hasadását idézi elő. A **145** származék volt a szialil Lewis X tetraszacharid első szulfonsav-mimetikuma.<sup>127,128</sup>



54. ábra. A szialil Lewis X első szulfonsav-mimetikumának szintézise

A glikozilezési lépésben lejátszódó eliminációs mellékreakció a szulfonsavcsoport elektronszívó hatásával magyarázható. Az elektronszívó hatás miatt a C-1 helyzetű protonok lazítottak, ezért az intermedier karbokation (III, IV) nemcsak glikozidképződés révén, hanem eliminációval is stabilizálódhat. Az **A**), **B**) és **C**) lépések sebességétől függ a glikozidképződés és az elimináció aránya (55. ábra).

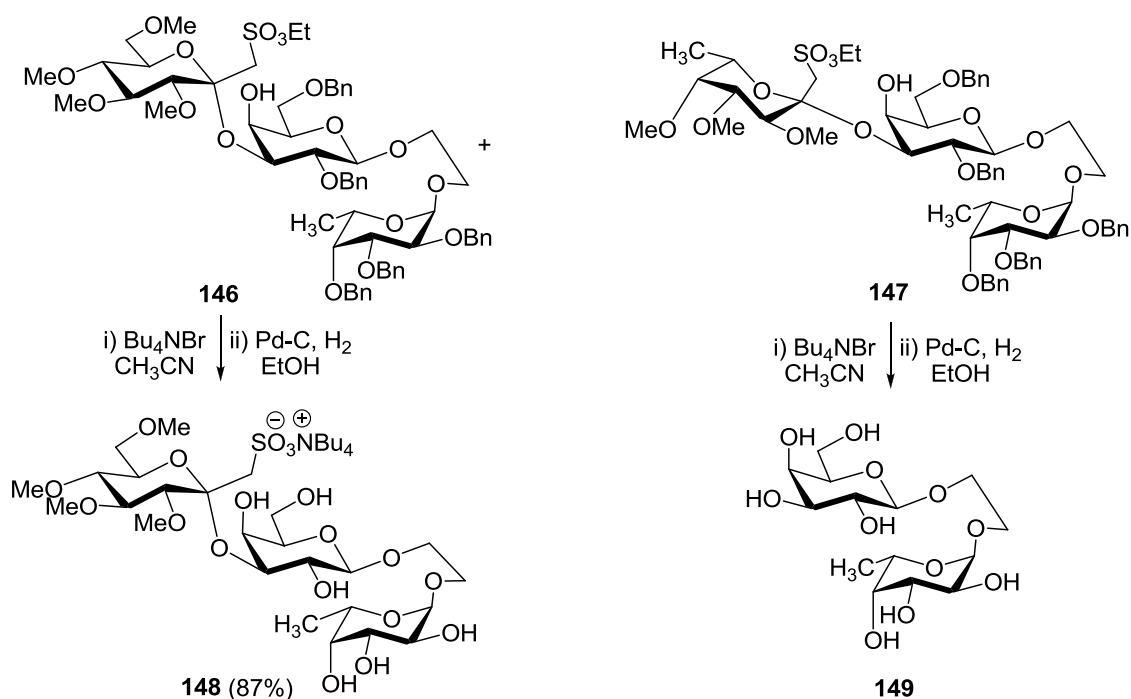


55. ábra. Glikozidképződés és elimináció a szulfonátometil-tartalmú karbénium ionból

A **142** akceptor, valamint permetilezett donorok felhasználásával két további pszeudotetraszacharidot is előállítottunk (**146** és **147**, 56. ábra).<sup>128</sup> A **146**-os származékból a védőcsoportok eltávolítása után jó hozammal kaptuk a szialil Lewis X egy újabb

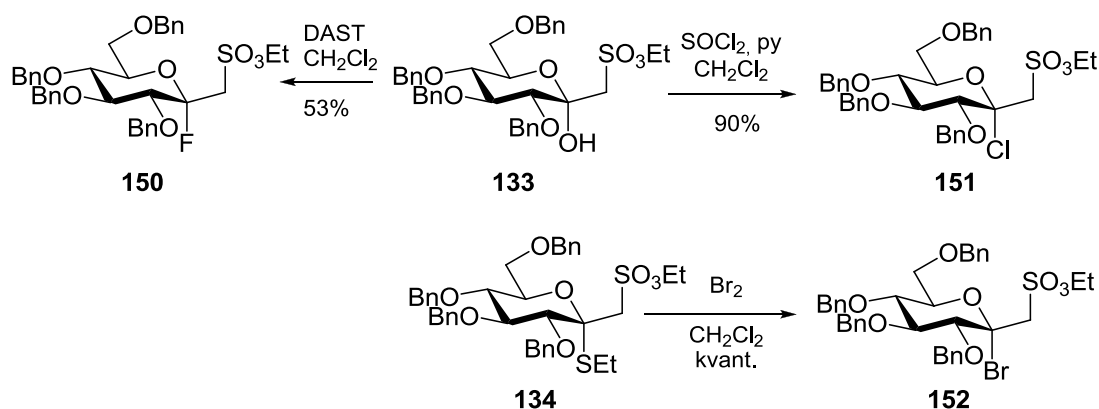
mimetikumát. Irodalmi adatok szerint apoláros molekularészlet, pl. a karboxilcsoporthoz kapcsolódó ciklohexilgyűrű növeli az  $sLe^x$  mimetikumok affinitását a szelektinekhez. Ennek alapján feltételeztük, hogy az apolárosabb **148** származék jobb kötési tulajdonságokat mutathat, mint a korábban előállított **145** vegyület.

Meglepetésünkre a **147**-ből nem sikerült az újabb, részlegesen metilezett mimetikumot előállítani, mert a védőcsoport-eltávolítás során lehasadt a szulfonsavtartalmú cukoregység, és kizárólag a **149** származékot tudtuk izolálni a reakcióelegyből. A váratlan mellékreakció a fukozidos kötés fokozott érzékenységevel magyarázható.

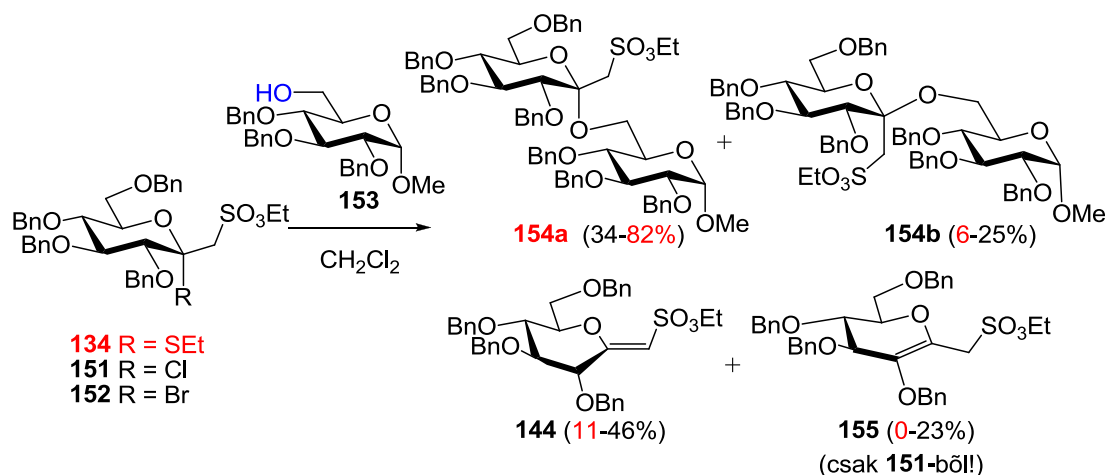


56. ábra. Kísérletek apoláros építőelemet tartalmazó  $sLe^x$  mimetikumok szintézisére

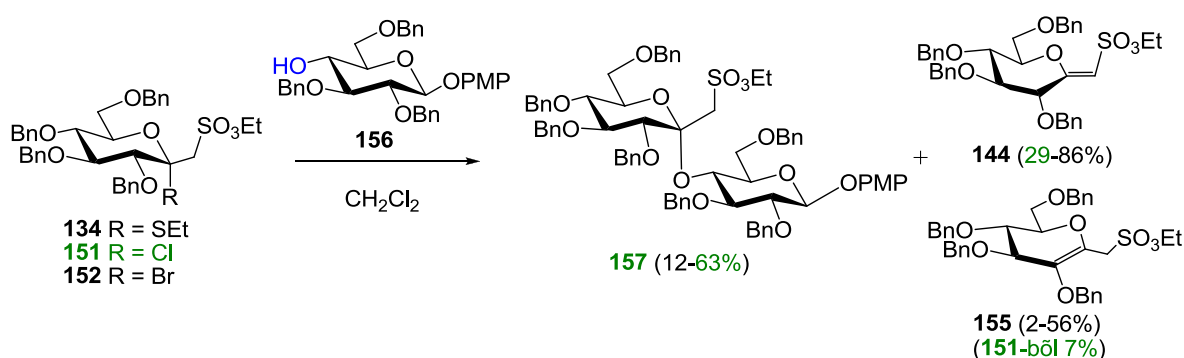
Az 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulozid tioglikozid származékaival végrehajtott glikozilezési reakciókban (**143**, **146** és **147** előállítása) mindig fellépett a donor eliminációs mellékreakciója, ami jelentősen rontotta a hozamot, ezért a további mimetikumok szintézise előtt megvizsgáltuk, hogy milyen donorokkal és glikozilezési körülményekkel érhető el hatékonyabb glikozid-képződés. A **133** hemiacetálból glikozil-fluoridot és kloridot állítottunk elő (**150** és **151**), a **134** tioglikozidból pedig 2-bróm-származékot képeztünk (57. ábra), majd megvizsgáltuk a **134** tioglikozid és a **150-152** glikozil-halogenidek teljesítőképességét glikozidképzési reakciókban.<sup>132,134</sup> A glikozil-fluorid alkalmazásával hamar felhagytunk, mivel kis reaktivitása miatt csak nagyon gyenge hozamot eredményezett.

57. ábra. Halogenid donorok (**150-152**) szintézise

A szisztematikus vizsgálatok során alkoholokat és különböző reaktivitású glükózid akceptorokat glikozileztünk, a tioglikozid donort NIS-TfOH és metil-triflát promoterekkel, a halogenideket pedig Hg(II)-sókkal vagy ezüst-trifláttal aktiváltuk. A fontosabb eredményeket a **153** és **156** glükózid akceptorok reakcióin mutatom be (58-59. ábra). A **153** akceptor reaktív, szterikusan nem gátolt primer hidroxiljának glikozilezésekor minden reakcióban anomerkeverék-diszacharidok képződtek (**154a,b**), de mindig az  $\alpha$ -anomer volt a domináns termék (58. ábra). Legjobb hozamot és  $\alpha$ -szelektivitást tioglikozid donor és NIS-TfOH aktiválás esetén tapasztaltunk,  $-50^\circ\text{C}$ -on (**154a**: 82%, **154b**: 6%). A kisebb reaktivitású glikozil-halogenidek reakciója csak magasabb hőmérsékleten ment végbe ( $-15^\circ\text{C}$  – szobahő), és ekkor nagyobb arányú volt az eliminációs mellékreakció. Glikozil-kloridból egy új melléktermék, a **155** endoglikál is megjelent a reakcióelegyben, ami feltételezésünk szerint közvetlenül a donorból képződhetett, hidrogénklorid eliminációval.

58. ábra. Primer hidroxilt tartalmazó akceptor (**153**) glikozilezése. A leghatékonyabb glikozilezés reakciókörülményei: **134** donor, NIS (1,2 ekv.), TfOH (0,4 ekv.),  $-50^\circ\text{C}$ , 1 óra

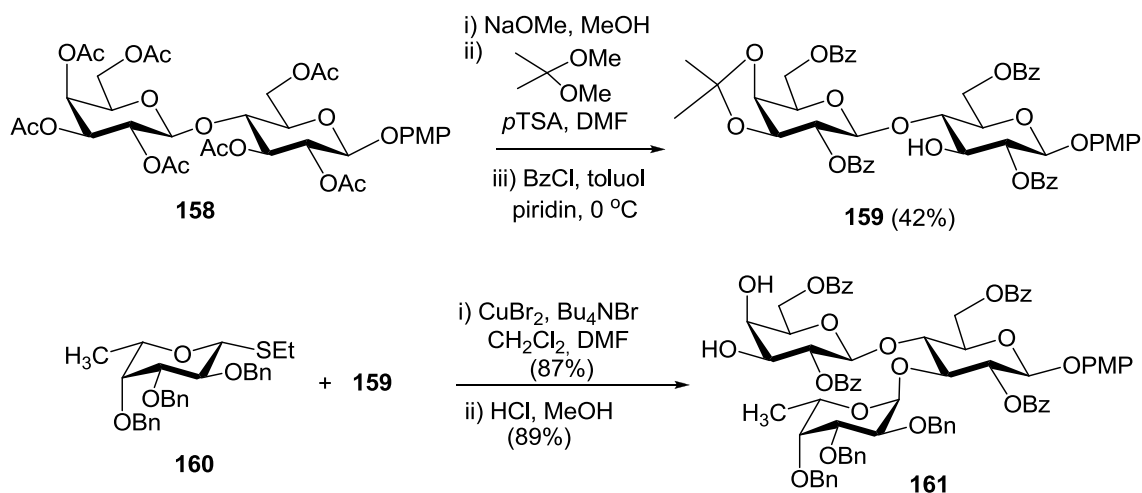
Kis reaktivitású akceptor (**156**) glikozilezésekor mindig kizárólag  $\alpha$ -glikozidos kötésű diszacharid képződött (**157**). A reaktív tioglikozid alkalmazásakor előtérbe került az elimináció, a glikozidképzés rossz hozammal ment végbe (**157**: 11-17%). Az exoglikál minden reakcióban jelentős arányban képződött, és mind a klorid-, mind a bromid-donorból képződött endoglikál melléktermék is. A legjobb glikozilezést klórcukor donorral sikerült elérni AgOTf aktivátor jelenlétében 0 °C-on, lassú, 1-5 napos reakcióban. A glikozil-bromid a tioglikozidnál jobb, a klorid-donornál gyengébb hozamot eredményezett (59. ábra).



59. ábra. Kis reaktivitású, szekunder hidroxilt tartalmazó akceptor (**156**) glikozilezése. A leghatékonyabb glikozilezés reakciókörülményei: **151** donor, AgOTf (2 ekv.), 0 °C, 2 nap

Összességében azt állapítottuk meg, hogy mivel a glikozidképződés és az elimináció versengő reakciók, ezek aránya nagymértékben függ az akceptor reaktivásától. Legjobb hozamot úgy érhetünk el, ha a glikozil donor aktiválásának sebességét az akceptor reaktivásához igazítjuk. Reaktív akceptorok esetén reaktív donor és erőteljes promoter a leghatékonyabb (pl. tioglikozid és NIS-TfOH) - ekkor a glikozilezés alacsony hőmérsékleten megy végbe, és az elimináció nem jelentős. Kis reaktivitású akceptorok esetén olyan donor és aktiválási módszer a leghatékonyabb, ami magasabb hőmérsékleten is csak lassan generálja az oxokarbénium iont, így az akceptor nagy feleslegben lesz jelen a karbénium-ionhoz képest, ami a glikozidképződés irányába tolja el a reakciót. Javítja a hozamot az akceptor-felesleg alkalmazása is, legjobb kitermelést donor : akceptor = 1 : 2 molaránynál értünk el.

A glikozilezési reakciók tapasztalatait felhasználva előállítottuk a szialil Lewis X egy újabb, tetraszacharid-szulfonsav mimetikumát is.<sup>134</sup> A Lewis X triszacharidnak egy egyszerűsített származékát, a glükózamin rész helyett glükózt tartalmazó **161**-et kívántuk felhasználni a szintézishez, mivel így a kereskedelmi forgalomban kapható, olcsó laktózt használhattuk kiindulási anyagként (60. ábra).

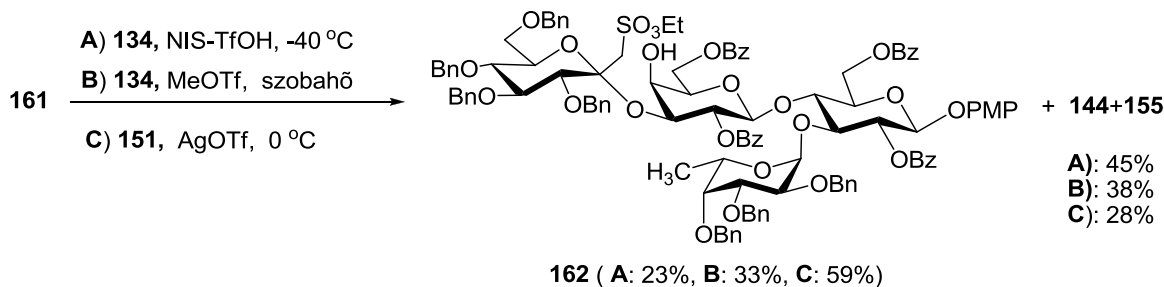


60. ábra. Lewis X analóg triszacharid szintézise laktozidból

A laktozból két lépésben előállított peracetilezett *p*-metoxifenil-laktozidot (**158**) dezacetilezés és izopropilidénezés után szelektíven benzoileztük,<sup>142</sup> és az így nyert akceptort (**159**) fukozileztük. A **160** etiltio-fukoziddal metil-triflát aktivátor jelenlétében végzett glikozilezési reakcióban sem a szelektivitás, sem a hozam nem volt kielégítő. Sokkal jobb eredményt értünk el, amikor a tioglikozidot réz(II)-bromiddal a reakcióelegyben glikozil bromiddá alakítottuk át, majd Lemieux szerint *in situ* anomerizációs aktiválást alkalmaztunk.<sup>42d</sup> A kapott triszacharidot savas hidrolízissel alakítottuk át a **161** akceptorrá (60. ábra).

A szulfonsav-tartalmú cukoregység beépítésére felhasználtuk a **134** tioglikozidot (A és B út) valamint a **151** glikozil-kloridot is (61. ábra). Az A) reakcióút csekély hozamát (23%) úgy értelmezhetjük, hogy a hatékony promotor (NIS-TfOH) hatására gyorsan képződik a donorból az intermediér kation, amivel a kis reaktivitású nukleofil (3'-OH) csak lassan reagál, így előtérbe kerül az elimináció. A B) reakcióban metil-triflát promotert alkalmaztunk szobahőmérsékleten. Azt vártuk, hogy az enyhébb aktiválószerrel lassabban képződik az oxokarbénium-intermediér, így kedvezőbb lesz a karbokation - nukleofil arány, és így a glikozidképződés irányába tolódik el a reakció. Az aktiválási folyamat valóban lelassult (a donor átalakulása 2 napot vett igénybe szobahőmérsékleten), ám a glikozidképződés hozama csak kis mértékben javult (33%). Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy a magasabb hőmérsékleten az elimináció gyorsabban játszódott le. Várakozásainknak megfelelően a kis reaktivitású **161** akceptort a **151** glikozil-kloriddal tudtuk leghatékonyabban glikozilezni. A donor aktiválása 0 °C-on ment végbe, ezen a hőmérsékleten a glikozilezési reakció sebessége felülmúlta az eliminációét, és 59%-os hozammal eredményezte a kívánt tetraszacharidot.



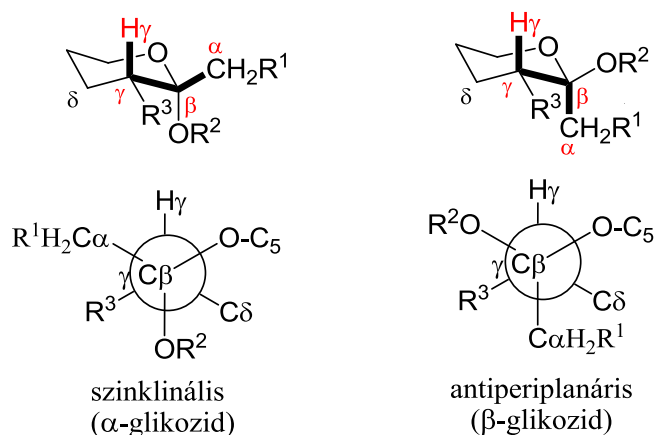


61. ábra. A szialil Lewis X tetraszacharid-szulfonsav mimetikuma

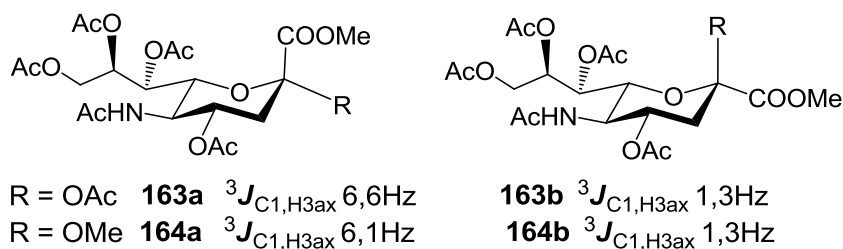
#### 4.4.2. A proton-szén három kötésen át ható csatolási állandók szerepe ketozil-glikozidok szerkezetvizsgálatában<sup>130</sup>

A szénhidrátok anomer konfigurációját NMR módszerekkel általában a  $^3J_{\text{H1,H2}}$  vagy az  $^1J_{\text{C1,H1}}$  csatolási állandók mérésével határozzák meg, ahol H1 az anomer proton. A kvaterner anomer szénatomot tartalmazó cukroknál, így a ketózok, az ulózsavak (pl. *N*-acetyl-neuraminsav, KDO), és az általunk előállított, anomer-szulfonsavmetil elágazást tartalmazó származékok esetében ez a módszer nem alkalmazható, mivel nem rendelkeznek anomer protonnal. Ilyenkor a három kötésen át ható proton-szén csatolási állandó nyújt információt az anomer centrumhoz kapcsolódó csoportok térállásáról.

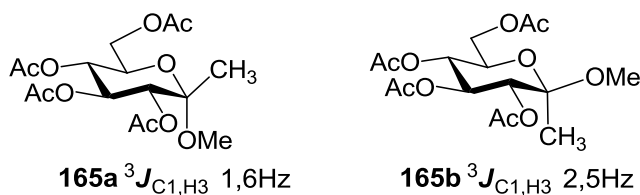
A proton-szén három kötésen át ható csatolási állandókra (általánosan  $^3J_{\text{C}\alpha,\text{H}\gamma}$ ) is érvényes a Karplus-típusú összefüggés,<sup>138-140</sup> amely a  $\text{C}_\alpha$  és  $\text{H}_\gamma$  torziós szögének függvénye a  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma\text{-H}_\gamma$  csatolási úton. Merev szénhidrogénekre<sup>143</sup> a  $^3J_{\text{C,H}}$  értékét 2,0 Hz-től ( $60^\circ$ ) 9,4 Hz-ig ( $180^\circ$ ) becsülik. Ketozil-glikozidoknál a  $\text{C}_\beta$  a cukorgyűrűben lévő kvaterner anomer-szénatom (C2), ennek megfelelően a csatolási út a C1-C2-C3-H3 kötéseknek, a mért csatolási állandó pedig a  $^3J_{\text{C1,H3}}$  értékének felel meg. A gyakorlatban ez a módszer csak akkor nyújthat megfelelő információt, ha  $\text{H}_\gamma$  axiális térállású, mint a *glüko*- vagy *galakto*-konfigurációjú származékokban (62. ábra).

62. ábra:  $C_\alpha$  és  $H_\gamma$  torziós szöge a  $C_\alpha$ - $C_\beta$ - $C_\gamma$ - $H_\gamma$  csatolási úton

A ketopiranozil glikozid anomer párok irodalmi  $^3J_{C,H}$  csatolásai állandó értékei két csoportra oszthatók: az egyik csoportnál jelentős, a másik csoportnál viszont csekély különbség van az anomerek csatolási állandói között. Az első csoportba tartoznak a KDO és a szíálsav *O*-glikozidjai,<sup>138,144</sup> valamint a ketozil-azidok, amidok és bromidok.<sup>145</sup> A szíálsav 2-*O*-acetyl és 2-*O*-metil származékainak  $\beta$ -anomerjénél 1,3 Hz-es csatolási állandót mértek (**163b** és **164b**, ekvatoriális COOMe, *szinklinális* elrendeződés), míg jóval nagyobb, 6 Hz körüli értéket tapasztaltak az  $\alpha$ -anomereknél (**163a** és **164a**, *antiperiplanális* elrendeződés).<sup>138</sup> (63. ábra)

63. ábra: Szíálsav anomer-párok  $^3J_{C1,H3}$  csatolási állandó értékei<sup>138</sup>

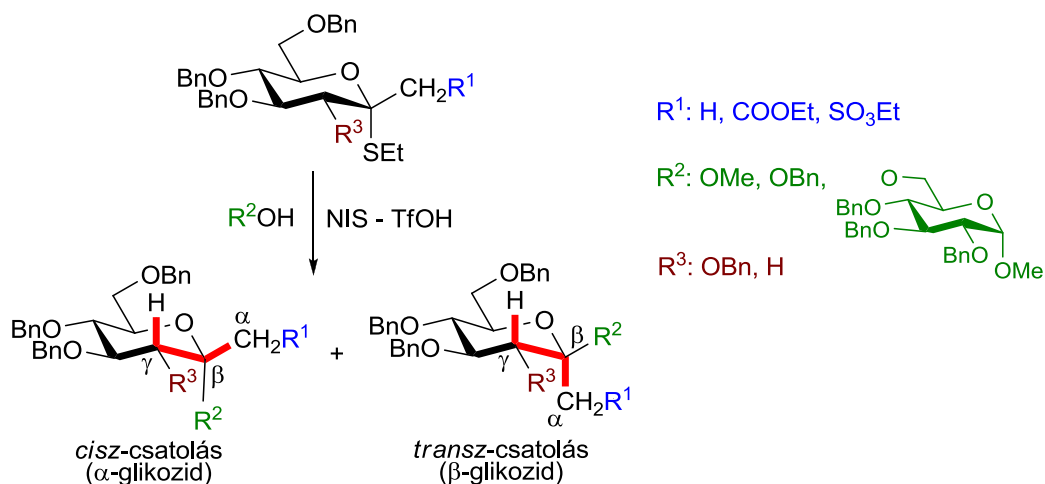
Ugyanakkor KDO- és szíalil-származékokon kívül nagyon kevés irodalmi példa van egyéb ketopiranozil-*O*-glikozidok anomer párjaira vonatkozólag.<sup>146</sup> Ezekben az esetekben a  $\beta$ -anomerekre meglepően kicsi csatolási állandókat közöltek, a **165** metil-hept-2-ulopiranozidnál az  $\alpha$ - és  $\beta$ -anomerek csatolási állandói között 1 Hz-nél kisebb különbséget írtak le<sup>146a</sup> (64. ábra).



64. ábra: Metil-hept-2-ulopiranozid  $\alpha$ - és  $\beta$ -anomerjének  $^3J_{C1,H3}$  csatolási állandó értékei

A fenti példa és saját eredményeink is azt sugallták, hogy a csatolási állandón alapuló konfiguráció-meghatározás csak korlátozottan használható. Hogy ezeket a korlátokat pontosan megismerjük, szisztematikus vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy a csatolási úthoz kapcsolódó szubsztituensek hogyan befolyásolják a  $^3J_{C1,H3}$  értékét.

A megfelelő 2-etiltio-glikozidokból (65. ábra) olyan ketozil-glikozid anomer párokat állítottunk elő, amelyekben különböző szubsztituensek kapcsolódtak a  $C\alpha$ ,  $C\beta$  és  $C\gamma$  atomokhoz, majd megmértük a háromkötéses proton-szén csatolási állandókat.

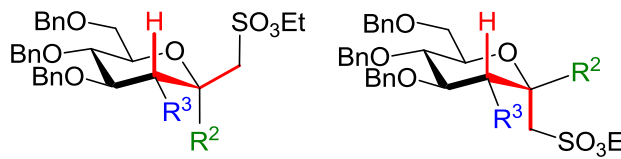


65. ábra. Keropiranozil-glikozid anomer párok szintézise

Mivel az 1-dezoxi-1-szulfonsav származékok ( $R^1=SO_3Et$ ) szerkezetmeghatározása volt számunkra a legfontosabb, ezért elsőként ezeknél a vegyületeknél vizsgáltuk az  $R^2$  és  $R^3$  szubsztituensek hatását (66. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az anomer pároknál mind a *cisz*-, mind a *transz*-csatolások kis értékek – kivéve a **170b** vegyületet –, és az  $R^2$  szubsztituensek hatása nem jelentős. Azt is megfigyeltük, hogy az *S*-glikozidok *cisz*-csatolása mindig nagyobb, mint a megfelelő *O*-glikozidoké – lásd **133**, **134** és **168**, **169** párokat –, itt azonban a *cisz*- és *transz*-csatolások összehasonlítására nem volt lehetőség, mivel *transz*-csatolású tioglikozidokat, azaz  $\beta$ -anomereket nem sikerült előállítani.

Ugyanakkor az  $R^3$  szubsztituens jelentősen befolyásolja a *transz* csatolási állandó értékét (**166b**: kis *transz*-csatolás, **170b**: nagy *transz*-csatolás). Amennyiben a C3 nem

szubsztituált (**170b**:  $R^3 = H$ , 3-dezoxi származék), akkor kapjuk az elméletileg várt (a Karplus összefüggésből levezethető) nagy csatolási állandót. A C3-helyzethez kapcsolódó elektronegatív szubsztituens (**166b**:  $R^3 = OBn$ ) viszont erősen lecsökkenti a *transz*-csatolás értéket (66. ábra).



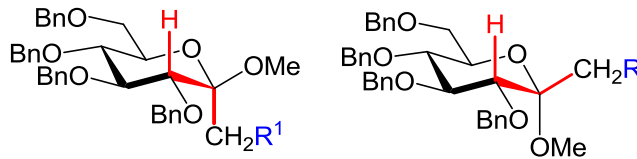
$R^3 = OBn$	$R^2$	$^3J_{C1,H3,cisz}$ (Hz)	$^3J_{C1,H3,transz}$ (Hz)
<b>133</b>	OH	2,1	-
<b>134</b>	SEt	2,7	-
<b>166a,b</b>	OMe	< 1	2,4
<b>167a,b</b>	OBn	< 1	2,3
<b>154a,b</b>	(1-6)-tri-OBn	< 1	2,5
$R^3 = H$	$\alpha$ -MeGlc p	< 1	2,5

<b>168</b>	OH	2,2	-
<b>169</b>	SEt	3,2	-
<b>170a,b</b>	OMe	< 1	4,8

66. ábra. A  $\beta$ - és  $\gamma$ -szubsztituensek ( $R^2$ ,  $R^3$ ) hatása a csatolási állandóra

Az  $R^1$  csoport (az  $\alpha$ -szénatom szubsztitúciója) hatásának vizsgálatához előállítottuk az 1-dezoxi-hept-2-ulóz (**171**:  $R^1=H$ ), valamint az etoxikarbonillal szubsztituált okt-3-ulóz (**172**:  $R^1=COOEt$ ) metil-glikozidjait (67. ábra). A mérések azt mutatták, hogy amennyiben a C1-atomhoz nem kapcsolódik elektronszívó szubsztituens, akkor a *transz*-csatolás nem változik, a *cisz*-csatolás viszont megnövekszik, így ennél az anomer-párnál volt a legkisebb különbség a  $^3J_{C1,H3}$ -értékekben (**171a**: 1,8 Hz, **171b**: 2,6 Hz). Az 1-dezoxi-1-szulfonsav származékoknál az észter- és a só-forma (**166** és **173**) csatolási állandói között semmilyen különbség nem mutatkozott.



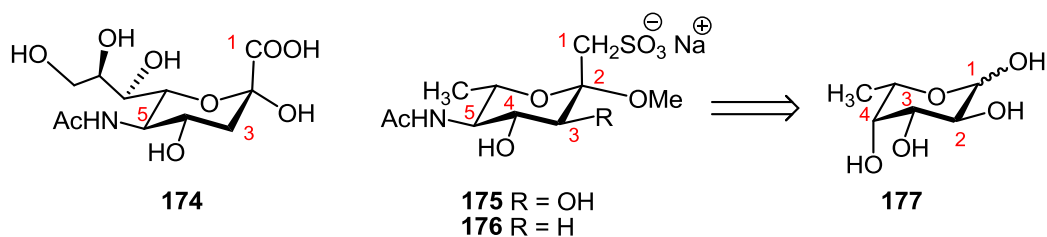
	$R^1$	$^3J_{C1,H3,cisz}$ (Hz)	$^3J_{C1,H3,transz}$ (Hz)
<b>171a,b</b>	H	1,8	2,6
<b>172a,b</b>	COOEt	< 1	2,6
<b>166a,b</b>	SO3Et	< 1	2,4
<b>173a,b</b>	SO3Na	< 1	2,4

67. ábra. Az  $\alpha$ -szubsztituensek ( $R^1$ ) szerepe a csatolási állandóra

Összességében megállapítottuk, hogy anomer párok esetében a  $C\alpha$  és  $H\gamma$  szinklinális elrendeződésénél (*cisz*-csatolás) mindig kisebb a  $^3J_{C,H}$  érték, mint az antiperiplanális elrendeződésénél (*transz*-csatolás), ám általában elég kicsi a különbség a két érték között. Az általunk vizsgált ketozil glikozidok  $\alpha$ -kötésű anomerjeinek *cisz*-csatolása  $\leq 1 - 3,2$  Hz között, míg a  $\beta$ -anomerek *transz*-csatolása  $2,3 - 4,8$  Hz között változott. Mindezek alapján a kvaterner anomer szénatomot tartalmazó szénhidrátok anomer konfigurációja a három kötésen át ható csatolási állandó alapján csak akkor határozható meg teljes biztonsággal, ha az adott származék mindkét anomerje hozzáférhető - ekkor a két  $^3J_{C,H}$ -érték közül a nagyobb mutatja a csatoló atomok *transz* elrendeződését. Ha azonban csak az egyik anomer áll rendelkezésre, akkor ajánlott más szerkezeti bizonyítékokat is keresni (pl. NOE-mérések, kémiai eltolódások vagy lehetőség szerint röntgenkristallográfiás mérések.)

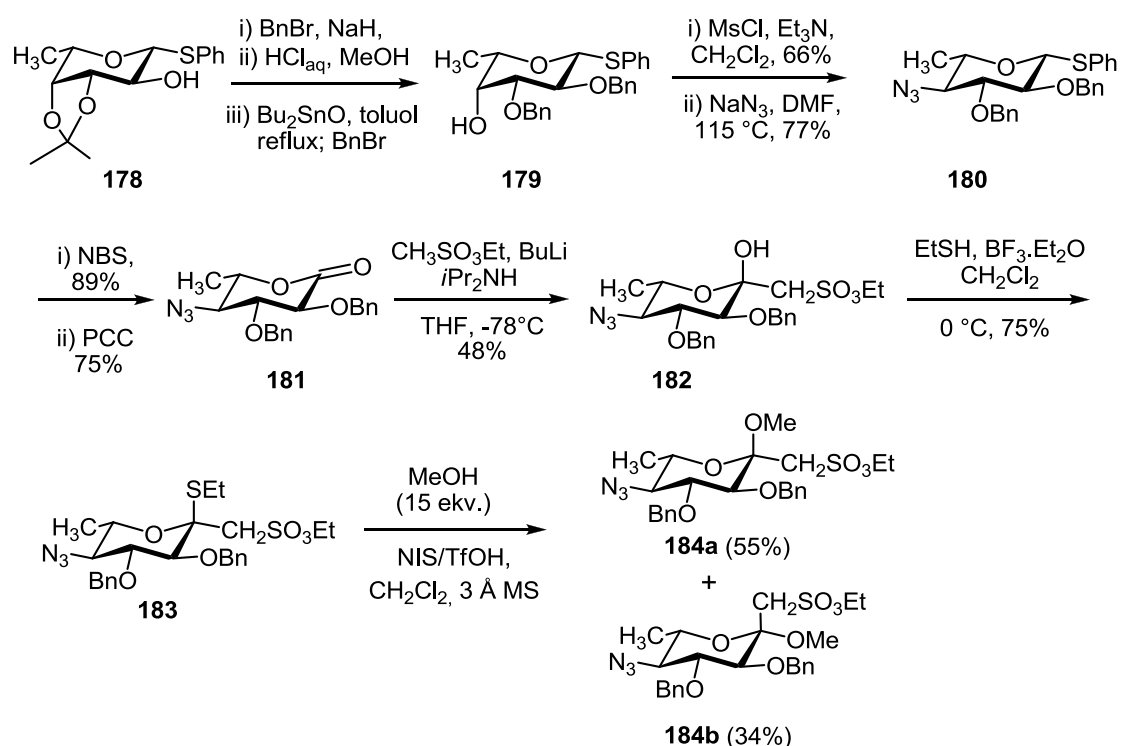
#### 4.4.3. Az *N*-acetil neuraminsav szulfonsav mimetikumának szintézise L-fukózból<sup>133</sup>

A szialil Lewis X tetraszacharid hatás-szerkezet vizsgálataiból kiderült, hogy az *N*Ac-neuraminsavnak csak a karboxilcsoportja létesít kötést a szelektinnel, ezért a glükózból előállított szulfonsavszármazékot (**134**) megfelelőnek találtuk szelektin-antagonisták szintézisére. Ez a származék azonban számos szerkezeti elemet nélkülöz (3-dezoxi-, 5-acetamido-funkció,  $^1C_4$  konformáció), amely más esetekben szerepet játszhat az *N*Ac-neuraminsav és különböző fehérjék közötti kölcsönhatás kialakulásában (pl. vírusos vagy bakteriális fertőzéseknél).<sup>147</sup> Ezért célul tűztük ki az *N*Ac-neuraminsav közelebbi analogonjainak szintézisét, amelyek felhasználhatók a különböző felismerési folyamatokban kulcsszerepet játszó szialsavtartalmú oligoszacharidok mimetikumainak előállítására. Olyan származékot terveztünk, amely az anomer helyzetű szulfonsavcsoport mellett tartalmazza az 5-acetamido-csoportot és a konformációja is megfelel a szialsav (**174**)  $^1C_4$  konformációjának. Mivel a dezoxigenált származék (**176**) szintézise nehéz feladatnak tűnt, először, mintegy előtanulmányként, a 3-hidroxi vegyületet (**175**) is előállítottuk (68. ábra).<sup>133</sup> Kiindulási anyagként az L-fukózt (**177**) használtuk, ami megfelelő térállásban tartalmazza a 3-as hidroxilt, és axiális 4-OH csoportja lehetővé teszi az ekvatoriális térállású acetamido-csoport kialakítását egy inverzióval járó nukleofil szubsztitúcióval.



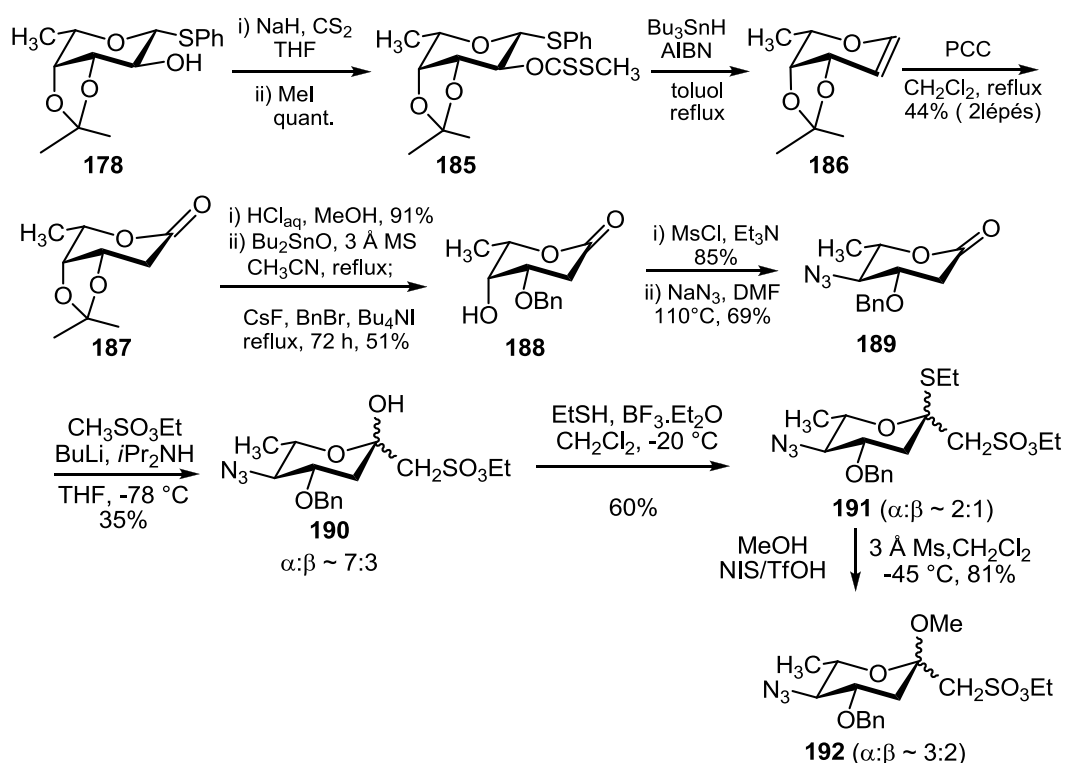
68. ábra. Az *N*Ac-neuraminsav, a tervezett szulfonsav-mimetikumok és a kiindulási L-fukóz

Mindkét szulfonsav-mimetikumot a fenil-3,4-*O*-izopropilidén-1-tio- $\alpha$ -L-fukopiranozidból (**178**) állítottuk elő. A nem-dezoxigenált származék szintézisének a 4-OH származékon (**179**) metánszulfonát távozó-csoportot alakítottunk ki, majd a terméket nátrium-aziddal reagáltattuk, így megkaptuk a 4-dezoxi-4-azido vegyületet (**180**). Ezután a feniltio-aglikont NBS-sel lehasítottuk, a keletkezett hemiacetált fukonsavvá oxidáltuk (**181**), majd karbanion-addícióval kialakítottuk az anomer helyzetű etilszulfonátometil-csoportot (**182**). A karbanion-addíció a korábbi tapasztalatoknak megfelelően sztereoszelektív módon adta az  $\alpha$ -anomert, amiből a szokásos módon, etántiollal képeztük a **183**  $\alpha$ -etil-tio-származékot. Végül, az anomer centrum fixálása céljából metil-glikozidot állítottunk elő, a reakcióban ~5:3 arányban képződött az  $\alpha$ - és  $\beta$ -anomer (69. ábra).



69. ábra A nem-dezoxigenált szulfonsav-mimetikumok szintézise L-fukózból

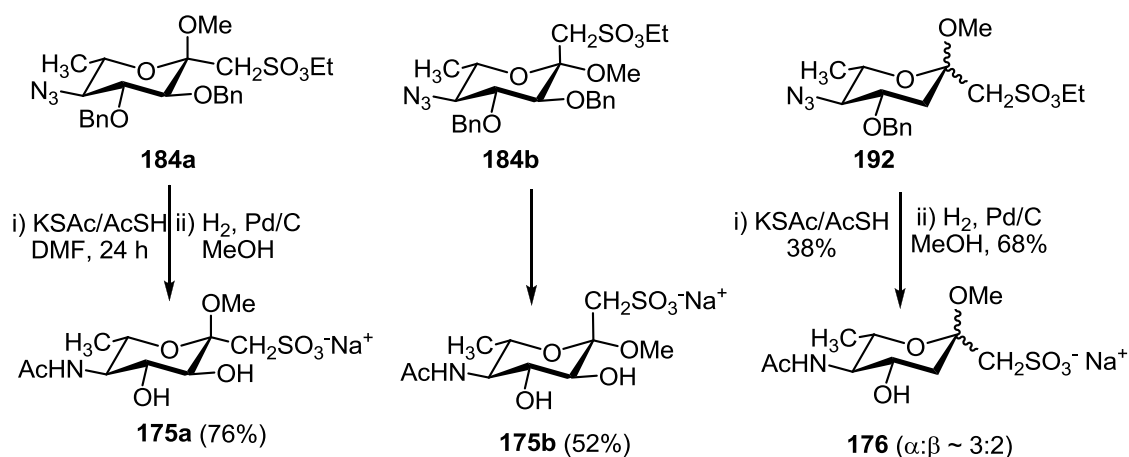
A 3-dezoxi-mimetikum szintézisének először 2-*O*-xantogenát származékot képeztünk (**185**), majd gyökös redukzív eliminációval egy lépésben elvégeztük a dezoxigenálást és az aglikon eltávolítását.<sup>148</sup> A **186** glikált piridinium-klórkromáttal 2-dezoxi-laktonná oxidáltuk,<sup>149</sup> majd két lépésben előállítottuk az azid-bevitelre alkalmas 4-OH származékot (**188**). Ezt követően a **181**→**184** szintézisútnak megfelelően végeztük az átalakításokat, ám a metánszulfonsav-etilészterrel végzett reakciónál (**189**→**190**) meglepő módon anomerkeverék formájában képződött a **190** szulfonátometil-származék. A diasztereomerek képződését a 2-helyzetű szubsztituens hiányával magyaráztuk. Az azonos kromatográfiás mobilitású anomereket nem sikerült szétválasztani, így keverékkel végeztük el a tioglikozidképzést. A reakció a szokásos hőmérsékleten (0 °C→szobahő) sikertelen volt, de -20 °C-on elfogadható hozammal kaptuk a kívánt terméket, α:β ~ 2:1 arányban. A tioglikozidot metilglikoziddá alakítottuk, a **192** termékben az NMR mérések szerint α:β ~ 3:2 volt az anomerek aránya (70. ábra).



70. ábra. Az 1,3-didezoxi-1-szulfonsav származékok szintézise L-fukózból

A szintézis utolsó szakaszában az azidocsoport acetamiddá alakítását és a védőcsoportok eltávolítását végeztük el. Az irodalomból ismert, hogy kálium-tiolacetát és tiolecetsav reagens-kombinációval az azidocsoport redukciója és a képződő amin acetilezése

egy reakcióelegyben végbemegy.<sup>150</sup> A módszer a mi esetünkben is kiválóan működött, ráadásul az erősen nukleofil tiolát anion ( $\text{AcS}^-$ ) egyúttal a szulfonsav-észterek etilcsoportját is lehasította. Végül a szulfonsav-sókról katalitikus hidrogénezéssel eltávolítottuk a benzil védőcsoportokat, így megkaptuk a tervezett szulfonsav-mimetikumokat (71. ábra).



71. ábra. Az acetamido-csoport kialakítása és a védőcsoportok eltávolítása

Megvizsgáltuk az L-fukózból előállított *N*Ac-neuraminsav mimetikumok (**175**, **176**) neuraminidáz-gátló hatását *Clostridium perfringens* neuraminidázon. A **175a** és **175b** származék inaktívnak bizonyult, a 3-dezoxi származék (**176**) viszont mM-os koncentrációban reprodukálható enzimgátlást mutatott ( $\text{IC}_{50}$  4,6 mM). Ennek alapján feltételezzük, hogy a **176** szerkezet megfelelően helyettesítheti oligoszacharidokban az *N*Ac-neuraminsavat, és így prekursora, a **191** tioglikozid felhasználható szialsavtartalmú szénhidrát-ligandumok új mimetikumainak előállítására. Ilyen irányú alkalmazás előtt azonban hatékonyabb szintézisút kidolgozására van szükség.

#### 4.4.4. A *Helicobacter pylori* fertőzés gyógyításában felhasználható anionos szénhidrátok szintézise<sup>129</sup>

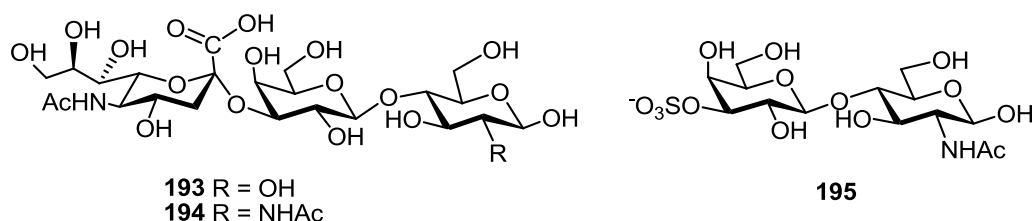
Ausztrál orvosok (Marshall és Warren) 1982-ben egy új, Gram-negatív baktériumot fedeztek fel gyomorfekélyes betegek gyomornyálkahártyáján. A gyomorkapu (pylorus) közelében megtalált, spirális alakú baktériumot *Helicobacter pylori*-nak nevezték el és úgy vélték, ez a kórokozó a felelős a gyomor- és nyombélfekély kialakulásáért.<sup>151</sup> A sokáig kételkedéssel fogadott elmélet később teljesen bizonyítottá vált, ezzel megnyílt az út a gyomor- és nyombélfekély antibiotikus kezelése előtt. (1994-ben Marshall és Warren orvosi Nobel-



díjat kapott nagy jelentőségű felfedezéséért.) A *Helicobacter pylori* fertőzés meglepően elterjedt, a fejlett országokban az emberek 25-50%-a, fejlődő országokban 70-90%-a fertőzött, de szerencsére a baktérium hordozóinak csak 10-20%-ánál alakulnak ki hurutos vagy fekélyes kórképek, esetenként gyomorrák.<sup>152</sup> A jelenlegi gyógymód kétféle antibiotikum és egy protonpumpa inhibitor kombinált alkalmazásán alapul, és az esetek 90%-ában a baktérium teljes eradikációját eredményezi. (A hazai terápiában klaritromicin + amoxicillin + protonpumpa-gátló kombinációt alkalmaznak 1 héten át, sikertelen kezelésnél más antibiotikumokkal újabb kúrát kezdenek.)

A baktérium megtelepedése két lépésben történik. Először a felületén lévő adhéziós fehérjék (adhézinek) lazán hozzákötődnek a gyomor nyálkahártyájának szénhidrát-egységeihez, majd az adhézinek és endotélium fehérje-receptorai között erősebb fehérje-fehérje kölcsönhatás alakul ki. A kolonizációs folyamat ismeretében feltételezhető, hogy ha a *H. pylori* szénhidrátkötő fehérjeit szintetikus ligandumokkal telítjük, akkor megakadályozhatjuk a baktériumok megtelepedését a gyomorban, tehát egy szénhidrát-alapú anti-adhéziós terápiával kiválthatjuk, vagy kiegészíthejük az antibiotikumos kezelést.

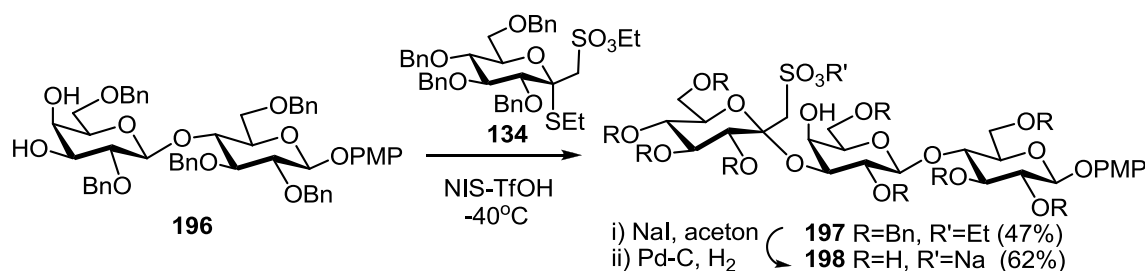
A *Helicobacter pylori* nagyon sokféle adhéziós fehérjével rendelkezik, ezért nagyon sokféle szénhidráthoz képes kötődni.<sup>153</sup> A baktérium ún. BabA adhézinjai (Blood-group antigen binding Adhesins) a neutrális vércsoport-oligoszacharidokhoz kötődnek, a SabA (Sialylated-blood-group antigen binding Adhesins) fehérjék pedig a szialilezett oligoszacharidokat (pl. sLe<sup>x</sup>) ismerik fel.<sup>154</sup> Ezen kívül a baktérium savas szénhidrát-ligandumaként azonosították a heparán szulfátot, a szulfatidokat, a 3'-szialilezett laktózt és laktóزامint (**193** és **194**), valamint a 3'-szulfatált laktóزامint (**195**, 72. ábra).



72. ábra. A *Helicobacter pylori* adhéziós fehérjéinek szénhidrát-ligandumai

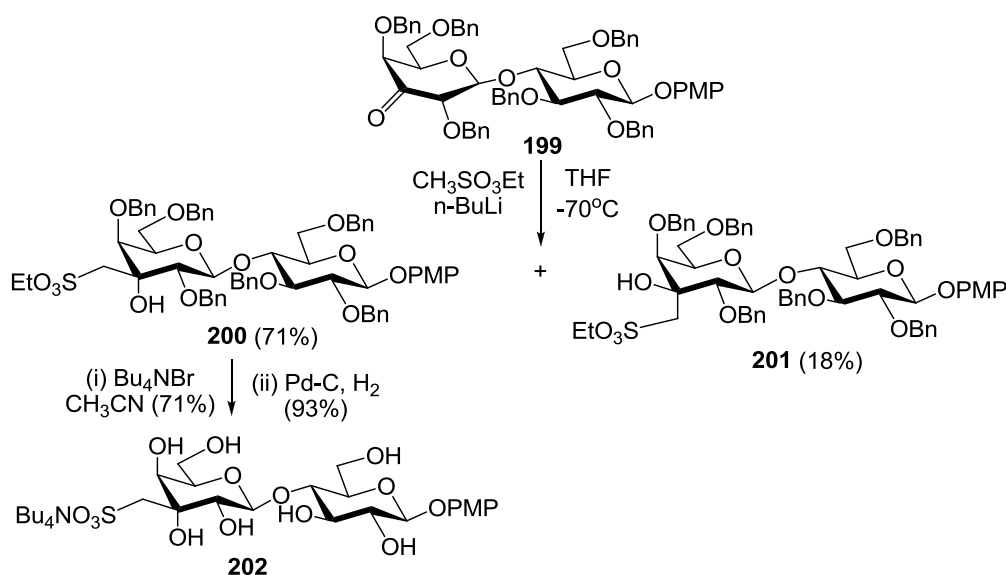
Mivel az anionos ligandumok nagyon hasonlítanak, illetve átfedésben vannak a szelektinek ligandumaival, célul tűztük ki az sLe<sup>x</sup> szulfonsav-mimetikumaihoz hasonló, laktóz-alapú *H. pylori* ligandumok szintézisét. Elsőként egy triszacharid-szulfonsav előállítását terveztük, amely a **193** természetes ligandum analogonjaként potenciális inhibitora

lehet a *H. pylori* adhéziós fehérjéinek (73. ábra). A szintézishez megfelelően védett laktozid akceptort használtunk (**196**), amit a **134** tioglikoziddal glikozileztünk. A főtermékként képződött  $\alpha$ -(2-3')-interglikozidos kötést tartalmazó **197** triszacharidból sóképzéssel, majd katalitikus hidrogénezéssel nyertük a *H. pylori* ligandumának szulfonsav-mimetikumát (**198**).<sup>129</sup> (Melléktermékként a **144** exoglikál, és  $\alpha$ -(2-4')-kötésű regioizomer triszacharid is képződött a glikozilezési reakcióban.)



73. ábra A *H. pylori* adhéziós fehérjéjének potenciális szulfonsav-liganduma

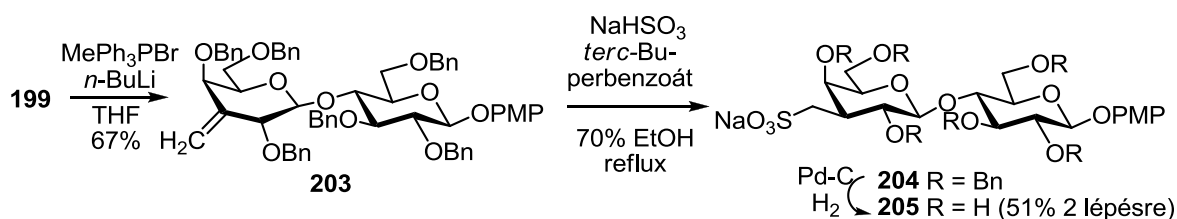
A szulfatált laktózin (195) analogonjaként bioizoszter szulfonsav-származékot terveztünk  $\text{OSO}_3^- \rightarrow \text{CH}_2\text{SO}_3^-$  cserével a 3'-helyzetben. Úgy véltük, hogy egy ilyen származék legegyszerűbben az anomer szulfonátometil-származék szintézisével analóg módon, metánszulfonsav-etilészterből generált karbanionnal állítható elő. A laktozid 3'-ulóz származékán (**199**) végrehajtott addíciós reakció ebben az esetben sztereoizomer-keveréket adott (**200** : **201** ~ 4 : 1), de szerencsére a szükséges, ekvatoriális szulfonsavmetil-csoportot tartalmazó sztereoizomer (**200**) volt a főtermék. A védőcsoportok eltávolítása után jó hozammal izoláltuk a **202** származékot, a szulfatált laktóz első bioizoszter szulfonsav mimetikumát (74. ábra).



74. ábra. A szulfatált laktóz bioizoszter szulfonsav-mimetikumának szintézise

Bár a bemutatott karbanion-addíciós módszerrel egyszerűen és jó hozammal lehetett bevezetni a szükséges szulfonátometil-csoportot, egyidejűleg egy nemkívánt hidroxilcsoportot is kialakítottunk a molekulán. Ezért újabb módszert kerestünk a bioizoszter szulfonsav-mimetikum előállítására. Alkán-szulfonsavak szintézisére régóta ismert eljárás az olefinekre történő hidrogénszulfid-addíció, ami egy regioszelektív gyökös láncreakció.<sup>155</sup> A láncvivő lépésben szulfid-gyökkanion addicionálódik a terminális szénatomra.

Szénhidrátokon is alkalmazták a módszert: metil-6-dezoxi-hex-5-enopiranozidokat reagáltattak vizes közegben nátrium-hidrogénszulfidtal, a reakcióban azonban meglehetősen rossz kitermeléssel képződtek a 6-dezoxi-6-szulfonsav származékok, C-5 epimerkeverékek formájában.<sup>156</sup> Japán kutatók szulfoorientált (szulfonsavtartalmú szeszkviterpén származékot) szintetizáltak exo-metilén csoporton végrehajtott hidrogénszulfid-addícióval. A reakciót vizes etanolban, *tercier*-butil-peroxibenzoát katalizátor jelenlétében hajtották végre, így kiváló hozammal és sztereoszelektivitással nyerték a kívánt terméket.<sup>157</sup> Ezeket a reakciókörülményeket alkalmasnak találtuk az általunk tervezett szulfonsav-mimetikum szintézisére. A **199** ulózból kiindulva először Wittig-reakcióval szén-szén kettős kötést alakítottunk ki a galaktóz 3-as helyzetében, majd a **203** exometilén-származékot nátrium-hidrogénszulfidtal reagáltattuk. Esetünkben a reakció teljes sztereoszelektivitással adta az ekvatoriális nátriumszulfonátometil-csoportot tartalmazó **204** származékot, amelyből a benzil védőcsoportok katalitikus hidrogenolízisével nyertük a **205** végterméket (75. ábra).<sup>129</sup>



75. ábra. A szulfatált laktóz bioizoszter szulfonsav-mimetikumának kétlépéses szintézise

A *Helicobacter pylori* potenciális ligandumainak biológiai vizsgálatát a Portói Egyetem Molekuláris Patológiai és Immunológiai Intézetében végezték el. Fluoreszcens jelzéssel ellátott, szialsavkötő (SabA) adhézinekkal rendelkező *H. pylori* törzzsel végzett kísérletekben azt találták, hogy a szulfonsav-tartalmú laktozidok gyengén gátolják a baktériumok kötődését egér gyomornyálkahártyán. Az immunológusok szerint jóval

dc\_228\_11

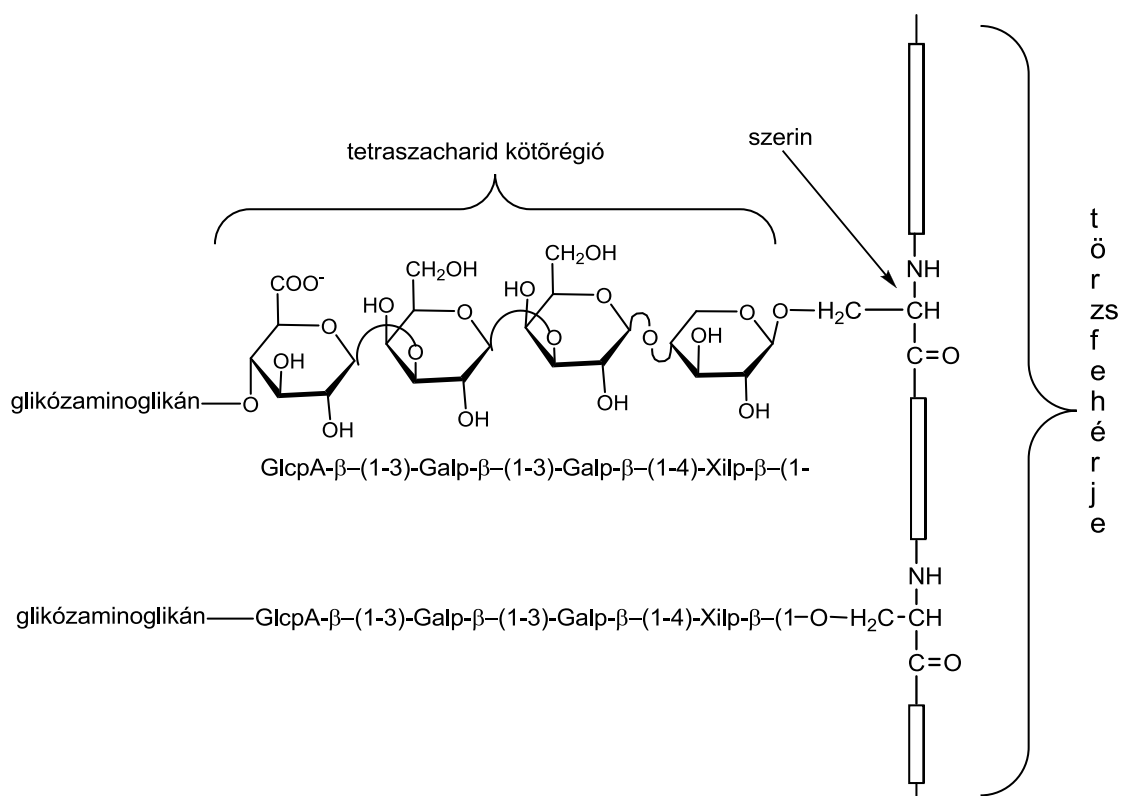
hatékonyabb gátlás várható a vegyületek fehérjekonjugátumaitól, ezért tervezzük a szénhidrát-szulfonsavak BSA-konjugátumainak előállítását.

## 5. Véralvadásgátló hatású heparinoid pentaszacharid-szulfonsavak szintézise

### 5.1. A heparin szerkezete és biológiai szerepe

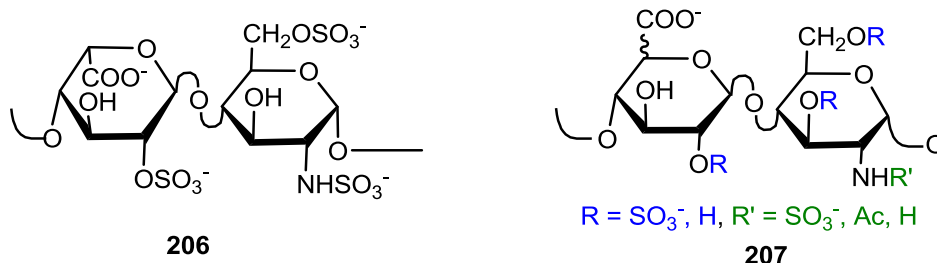
A heparin a glikózaminoglikán poliszacharidok egyik legismertebb képviselője. A glikózaminoglikán (GAG) összefoglaló néven ismert glükóz- és galaktózaminoglikánok a szervezetben nagy arányban előforduló polianionos lineáris heteropoliszacharidok, amelyek különböző fehérjékhez kötötten, proteoglikánok (PG) formájában találhatók a sejtek felszínén és az extracelluláris mátrixban, valamint bizonyos sejteknél a sejten belüli térben. A lineáris felépítésből adódóan oldataik nagy viszkozitásúak, ennek köszönhetően kiváló kenőfolyadékok, ugyanakkor merevségük gondoskodik a sejtek szerkezeti sértetlenségéről. Megtalálhatók az ízületekben, a csontokban, a szem csarnokvizében, a szaruhártyában és a szívbillentyűkben.

A különböző proteoglikánok szerkezete és bioszintézise nagyon hasonló. A folyamat a protein szintézisével kezdődik, ezután a kész protein bizonyos szerin egységeinek hidroxiljához egy-egy állandó szerkezetű tetraszacharid (D-glükuronsav-D-galaktopiranoz-D-galaktopiranoz-D-xilopiranoz) kötődik *O*-glikozidos kötéssel, majd ehhez a tetraszacharidhoz kapcsolódóan indul meg a különböző poliszacharidláncok szintézise. A bioszintézis eredménye egy 10 kDa - 500 kDa méretű fehérjetörzs, amelyhez változó számú (1->100) glikózaminoglikán lánc kapcsolódik. A cukorláncokat D-hexózaminból és hexuronsavból álló diszacharid ismétlődő egységek építik fel. A hexózamin-tartalom D-glükózamin vagy D-galaktózamin lehet, ezekhez D-glükuronsav, vagy L-iduronsav kapcsolódhat. A glükózaminoglikánok közé tartozik pl. a hialuronsav, a keratán-szulfát, a heparin és a heparán-szulfát. A galaktózaminoglikánok képviselői a kondroitin-4-szulfát, a kondroitin-6-szulfát és a dermatán-szulfát.<sup>158</sup>



76. ábra. A proteoglikánok szerkezete

A heparin glükózamin és hexuronsav egységekből (1-4)-kötésekkel felépülő, nagyon heterogén összetételű poliszacharid, a hexuronsav egysége D-glükuronsav és L-iduronsav lehet. Nemcsak proteoglikánként fordul elő, hanem fehérjéhez nem kötött, kisebb poliszacharidláncok formájában is, amelyek 10-40 kDa átlagos mérettel és 10-80 polimerizációs fokkal jellemezhetők. A heparin alapvetően kétféle diszacharid ismétlődő egységből épül fel: főkomponense a három szulfátcsoportot tartalmazó L-iduronsav-tartalmú **206** [ $\alpha$ -L-idoAp-2-O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(1-4)- $\alpha$ -D-GlcNHSO<sub>3</sub>-6-O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(1-4)-], emellett kisebb mennyiségben különböző mértékben szulfatált, D-glükuronsav- vagy L-iduronsav-tartalmú diszacharidokat (**207**) tartalmaz.<sup>159-161</sup>

77. ábra. A heparin diszacharid ismétlődő egységei, fő- (**206**) és minor (**207**) komponens

A poliszacharidlánc bioszintézise a Golgi készülékben zajlik, ahol a tetraszacharid kötőrégióhoz kapcsolódva először D-glükuronsavból és N-acetil-D-glükózaminból felépül egy

$[\beta\text{-D-GlcAp-(1-4)-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1-4)-}]_n$  szerkezetű prekursor lánc. A szintézis kb. 300 monoszacharid egység beépülése után fejeződik be, de már a lánchosszabbítással egyidejűleg elkezdődik a szerkezet módosítása. Először, minden további módosítás feltételeként a glükózamin egységek  $\text{NHAc} \rightarrow \text{NHSO}_3^-$  átalakítása történik meg, ezt követi a D-glükuronsavak C5-epimerizációja L-iduronsavvá, valamint szulfatálás az uronsavak 2-es, és a glükózamin 3-as és 6-os oxigénjén. A heparin nagyfokú heterogenitása abból adódik, hogy a poliszacharid módosítása csak részleges, az átalakítások nem mennek tökéletesen végbe minden monoszacharid egységén.<sup>158</sup>

A heparin véralvadásgátló hatását már felfedezésekor, 1916-ban felismerték, és javasolták alkalmazását koagulációs rendellenességek kezelésére. Erre azonban csak két évtizeddel később, a megfelelő tisztítási eljárás kidolgozása után került sor. A heparin azóta is a legáltalánosabban használt antitrombotikum, alkalmazása elsősorban alacsony moltömegű, ún. frakcionált heparin formájában történik, éves felhasználása 33 tonna (500 milló adag).<sup>158</sup>

A heparin a véralvadásgátláson kívül még nagyon sokféle biológiai folyamatban szerepet játszik, olyan módon, hogy különböző fehérjékhez kötődik és szabályozza biológiai aktivitásukat. Jelenlegi ismereteink szerint több mint száz fehérjével képes kötést kialakítani a sejtek felületén vagy az extracelluláris mátrixban. A kötődés elsősorban ionos jellegű, de hidrogénkötések és apoláros kölcsönhatások is szerepet játszhatnak benne. Széleskörű biológiai aktivitása miatt a heparin és származékai sokoldalú gyógyszerjelöltek, jelenleg is több területen vizsgálják terápiás alkalmazásuk lehetőségét (2. táblázat).<sup>158-161</sup>

Terápiás alkalmazási terület	Alkalmazás státusza
Antitrombotikum	alkalmazzák
Antiatheroszklerotikum	Klinikai kipróbálás alatt
Komplement inhibitor	Klinikai kipróbálás alatt
Gyulladásgátló	állatkísérletek
Angiogenezis-gátló	állatkísérletek
Rákellenes szer (antimetasztatikus, antiproliferatív hatás)	állatkísérletek
Alzheimer-kór elleni szer	állatkísérletek
Antivirális szer	állatkísérletek

2. táblázat. A heparin és heparionoidok mint potenciális terapeutikumok

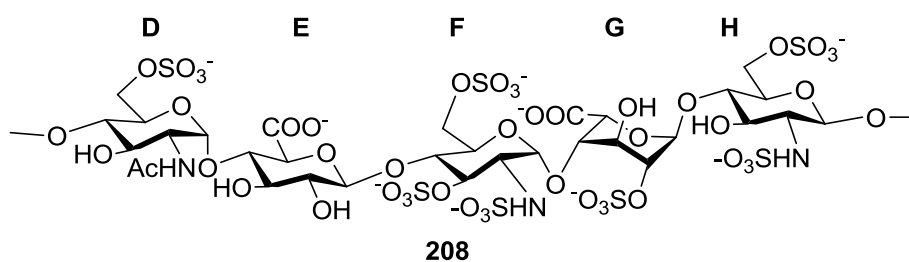
## 5.2. A heparin véralvadásgátló hatásának mechanizmusa. Az első szintetikus heparionoid gyógyszer kifejlesztése

A véralvadás folyamatában fontos szerepet játszik két szerin-proteáz, a Xa faktor és a trombin, az előbbi a protrombin→trombin, az utóbbi a fibrinogén→fibrin átalakulást katalizálja. A véralvadás bonyolult szabályozásában szükség van ezeknek a szerin proteázoknak a gátlására is, ezt a feladatot az antitrombin-III (AT-III) fehérje látja el. Az AT-III egy irreverzibilis, ekvimoláris komplex formájában gátolja a cél-enzimeket (trombint vagy Xa faktort), a komplexben az antitrombin aktív centrumának egy arginin egysége észterkötéssel kapcsolódik az enzim aktív centrumában található szerinhez.<sup>158</sup> A heparin antitrombotikus hatása abból származik, hogy aktiválni képes az antitrombint, és ezáltal az egyébként nagyon lassan zajló inhibíciót képes több nagyságrenddel felgyorsítani. Ekkor hármas komplex formájában történik a gátlás: az AT III reverzibilisen kötődik a heparinhoz, ennek hatására megváltozik a konformációja, és ehhez az alloszterikusan aktivált, heparinhoz kötött antitrombinhoz kapcsolódik irreverzibilisen, nagy affinitással a trombin. Végül az antitrombin-trombin komplex leválik a heparinról. A heparin által aktivált antitrombin 2000-szer gyorsabb gátlást eredményez, mint a szabad antitrombin.

A véralvadásgátlás mechanizmusának felderítésében az első lépés az antitrombin kofaktor szerepének felismerése volt, ezt követte a heparin antitrombin-kötő egységének azonosítása.<sup>162</sup> Az izolált majd szintetikusan is előállított, **DEFGH** doménként elnevezett antitrombinkötő pentaszacharid (**208**, 78. ábra)<sup>163</sup> vizsgálata során kiderült, hogy önmagában ez az egység is kötődik az AT III-hoz, és ennek következtében megtörténik az antitrombin



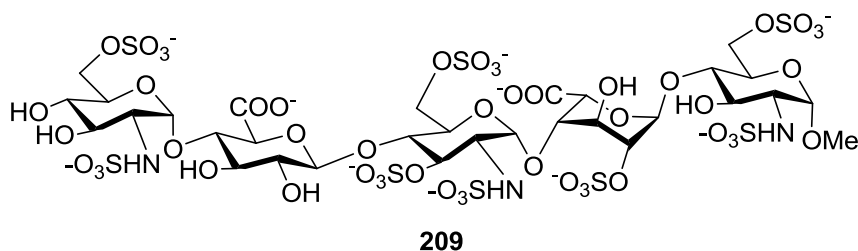
konformációjának megváltozása. A véralvadási faktorokkal végzett vizsgálatok szerint a pentaszacharid-antitrombin komplex a Xa faktort 300-szor gyorsabban gátolja, mint a szabad antitrombin, a trombingátlás sebességét azonban csak kétszeresére növeli. További szintetikus analógokkal végzett kutatások alapján kiderült, hogy a trombin gátlásához egy hosszabb, legalább tizenöt cukoregységből álló heparin-szakasz szükséges, mivel a heparin-antitrombin-trombin komplex kialakulásában a heparin templátként szerepel, a hármas komplex csak akkor jön létre, ha előtte mind a trombin, mind az antitrombin hozzákötődött a heparinhoz.



78. ábra. A heparin antitrombin-III kötő pentaszacharid egysége

A vizsgálatok ezen szakaszában kérdéses volt, hogy a Xa faktor gátlása megfelelő véralvadásgátló hatást eredményez-e. A bizonytalanságok ellenére a Sanofi és az Organon Gyógyszergyárak az antitrombin-kötő pentaszacharidon alapuló szintetikus gyógyszer kifejlesztését határozták el.<sup>164,165</sup> A szintetikus antitrombotikumok kutatását a heparin alkalmazásával kapcsolatos problémák indokolták. A heparin gyakori intravénás vagy szubkután adagolást igényel, mivel felezési ideje nagyon rövid (1-2 óra). Mellékhatásként súlyos vérzékenységet és a heparin indukálta trombocytopeniát (a vörösvértestek kórosan alacsony száma) okozhat. Komoly problémát jelenthet az állati forrásból izolált heparin szennyezettsége is. Egy kis méretű, pontosan ismert szerkezetű vegyülettől a mellékhatások csökkenését várták.

A Sanofi és az Organon közös programja keretében francia és holland kutatók 55 lépéses szintézissel előállították az antitrombin-kötő pentaszacharid módosított analógját, a fondaparinuxot (**209**, 79. ábra).<sup>164,165</sup> A bonyolult szerkezetű fondaparinux előállítása fantasztikus szintetikus teljesítmény volt, és klinikai vizsgálatai is sikeresen zárultak: kisebb dózisban, ritkább adagolás mellett jobb antitrombotikus hatást mutatott, mint a frakcionált heparin.<sup>166</sup> A vegyület Arixtra márkanéven vált gyógyszerre, törzskönyvezése 2001-ben történt meg.

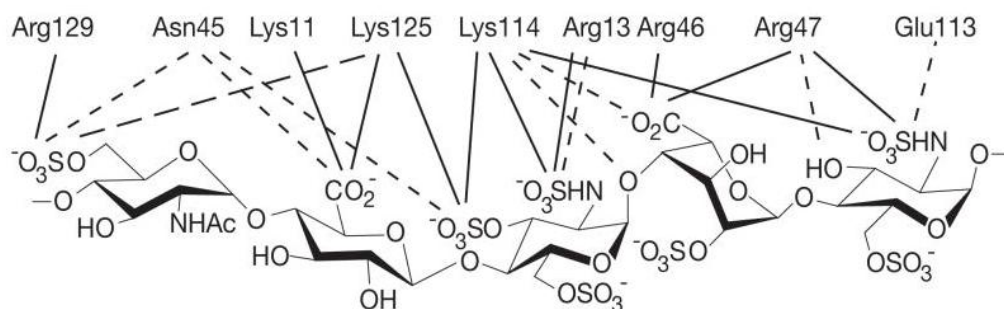


79. ábra. A fondaparinux (Arixtra®) szintetikus antitrombotikum szerkezete

### 5.3. Újabb, egyszerűbb szerkezetű szintetikus antitrombotikumok kutatása, az idraparinux szintézise

A fondaparinux rendkívül bonyolult szintézise miatt a gyógyszerkutatási program nem zárult le, tovább folytatódtak a hatás-szerkezet vizsgálatok. A cél egyszerűbb szerkezetű, még jobb hatású, és hosszabb felezési idejű származék kifejlesztése volt.

A heparin-pentaszacharid-antitrombin komplex röntgendiffrakciós szerkezete azt mutatta, hogy az AT-III faktorhoz történő kötődésben alapvető szerepe van a pentaszacharid uronsav és szulfátészter egységeinek, amelyek a fehérje arginin és lizin egységeivel alakítanak ki ionos kötések (80. ábra). Alapvető fontosságú az iduronsav (**G** egység) konformációs flexibilitása is, a stabil kötés feltétele, hogy az iduronsav  ${}^2S_0$  csavart konformációt vegyen fel. A komplex röntgenszerkezete alapján feltételezték, hogy a **H** egységen egy 3-*O*-szulfátcsoport képes újabb ionos kötés kialakítására a kötőhely egy arginin csoportjával, és hogy az uronsav 2-*O*-szulfát csoportja elhagyható.

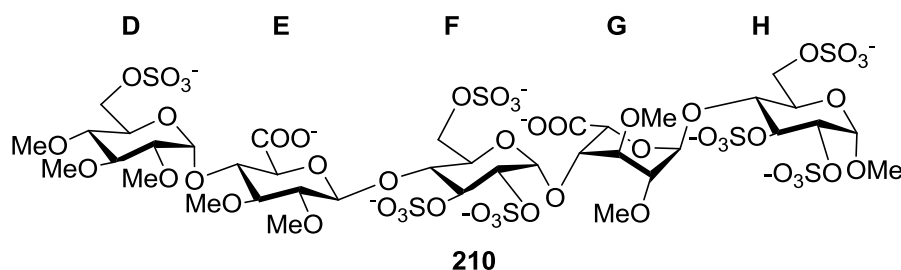


80. ábra Elektrosztatikus kölcsönhatások az antitrombin-pentaszacharid komplexben

Szisztematikus szintetikus munkával megvizsgálták az anionos csoportok minőségének szerepét is.<sup>167</sup> Ha az esszenciális szulfát csoportokat foszfátészterekkel, vagy az uronsavak karboxilcsoportját szulfátészterekkel helyettesítették, akkor teljesen hatástalan vegyületeket nyertek. Ugyanakkor a szulfamid-sav-csoportokat ( $\text{NHSO}_3^-$ ) a hatás elvesztése nélkül lehetett szulfátészter csoportokkal helyettesíteni. Ez az eredmény lehetővé tette, hogy a

glükóزامint glükózzal helyettesítve úgynevezett „nem-glikóزامino”-glikán analogonokat állítsanak elő, ami jelentősen leegyszerűsítette a szintetikus munkát.

A szintézis további egyszerűsítése céljából olyan „nem-glikóزامino”-glikán származékokat is előállítottak, amelyek a szabad hidroxilok helyett metilétereket tartalmaztak.<sup>164,168</sup> Kiderült, hogy ezek a vegyületek még erősebben kötődnek az antitrombinhoz, mint a szabad hidroxilt tartalmazó származékok, ami egyértelműen bizonyította, hogy a kötődésben a hidroxilcsoportok nem vesznek részt. A hatás-szerkezet összefüggés vizsgálat eredményei alapján az egyik legjobb hatású szintetikus analógnak az idraparinux (**210**) bizonyult.<sup>168</sup> Nemcsak szintézise volt jóval egyszerűbb, mint az Arixtráé, hanem farmakológiai tulajdonságai is kedvezőbbek voltak, nagyobb affinitással kötődött az antitrombinhoz, és jóval hosszabb volt a felezési ideje is. Elkezdték gyógyszerre fejlesztését, ám a klinikai vizsgálatok III. fázisában leállították, mivel 60 napos klinikai felezési ideje miatt az esetenként fellépő vérékenység kezelhetetlen volt.<sup>169</sup>



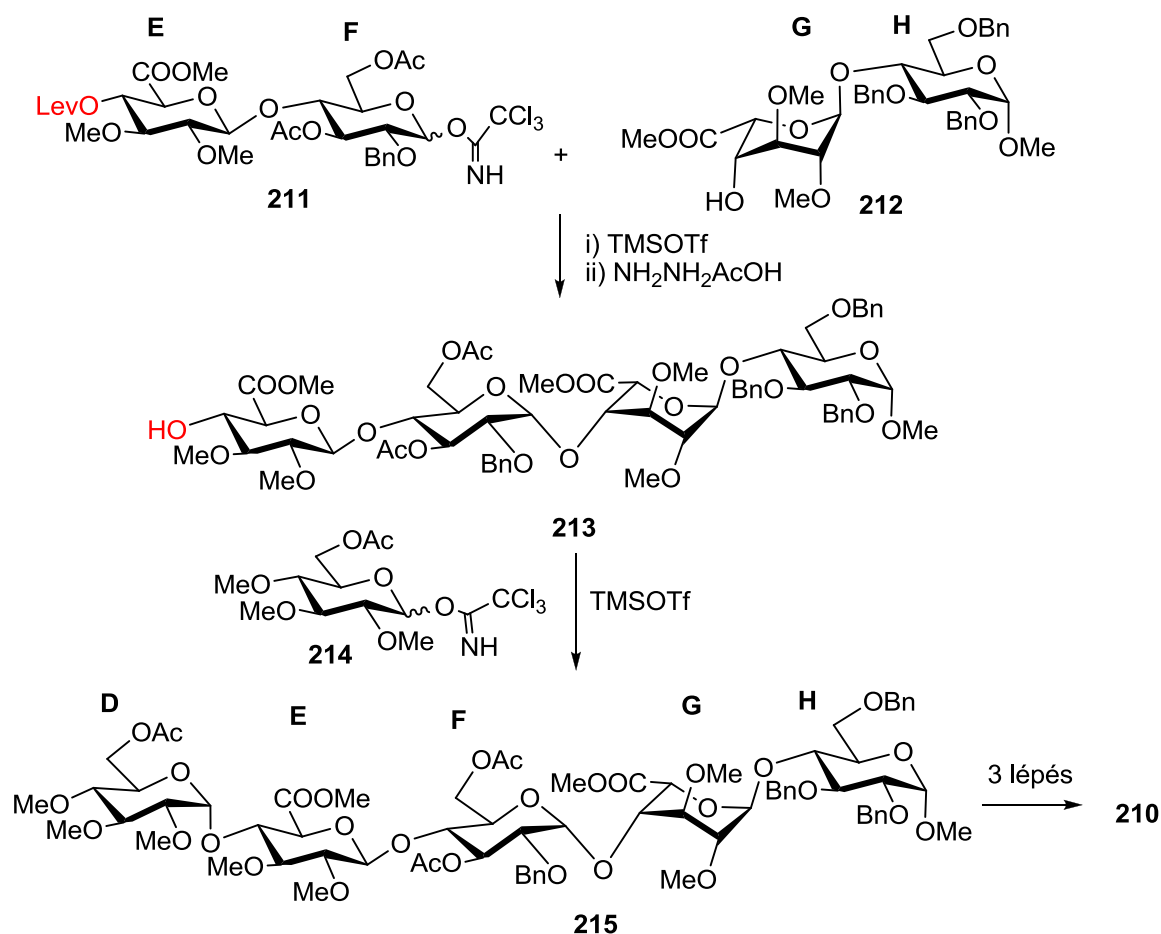
Pentaszacharid	Anti-Xa aktivitás (U/mg)	Kötési affinitás, Kd (nM)	Eliminációs T <sub>1/2</sub> (h)
<b>209</b>	700	754	0,7
<b>210</b>	1611	13	10,9

U/mg: heparinra vonatkoztatott aktivitás (Egység/mg); Kd: pentaszacharid-AT-III komplex disszociációs állandója; T<sub>1/2</sub>: felezési idő (*in vivo* patkány-kísérletekben nyert értékek)

81. ábra. Az idraparinux szerkezete. A fondaparinux (**209**) és az idraparinux (**210**) fontosabb farmkológiai jellemzői<sup>168a</sup>

Az idraparinux szintézise két okból is egyszerűbb, mint a fondaparinuxé, és általában a heparinoidoké. Egyrészt nem tartalmaz aminocukrot, ami nagy könnyebbség, hiszen az aminocukrokkal való szelektív glikozilezés, és az amino-védőcsoportok eltávolítása gyakran nagyon nehéz feladat. Másrészt nem kell külön, szelektíven eltávolítható csoportokkal védeni a szintézis során azokat a hidroxilokat, amelyek a heparin származékokban nincsenek szulfatálva; az utolsó lépésben, a szulfatészterek jelenlétében felszabadítani ezeket a hidroxilokat szintén nagyon problematikus. Az idraparinuxban a nem szulfatált hidroxilok

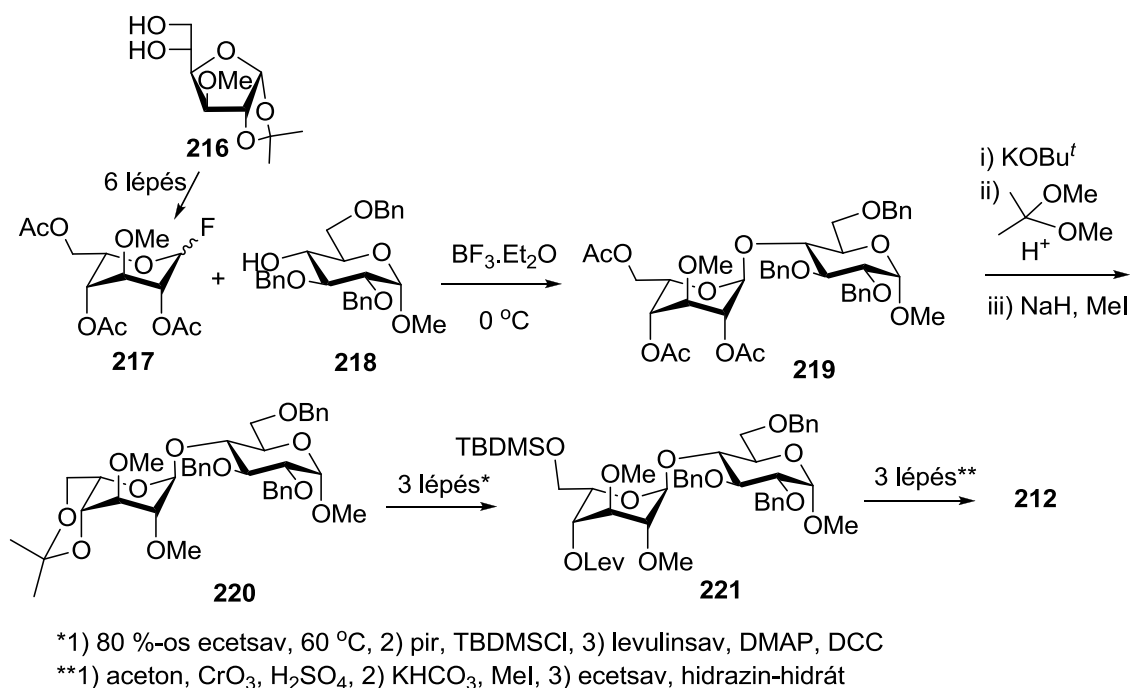
metilezett formában vannak, a metiléterek a szintézis megfelelő fázisában kialakíthatók, és mivel stabilak, bármilyen átalakítás elvégezhető a jelenlétükben. Mindezen „könnyítések” ellenére az idraparinux szintézise a két 1,2-*cis*z glikozidos kötés (**D-E** és **F-G** kapcsolat), és a két uronsav egység miatt még mindig nehéz és munkaigényes feladat, és átgondolt szintézisstratégiát igényel. Van Boeckel és munkatársai 1994-ben közölték az idraparinux első, [2+2+1] kapcsoláson alapuló szintézisét (82. ábra).<sup>168a</sup>



82. ábra. Az idraparinux szintézise

Az utolsó glikozilezési lépés **EFGH** tetraszacharid akceptorát (**213**) úgy nyerték, hogy az **EF** diszacharid donort (**211**) és a **GH** diszacharid akceptort (**212**) trimetilszilil-triflát aktivátor jelenlétében összekapcsolták, majd az **E**-egység 4-es helyzetű levulinoil védőcsoportját hidrazin-acetáttal eltávolították. Az így nyert **213** tetraszacharidot glikozilezték a **214** glükózil-triklóracetimidát-donorról. A képződő **215** pentaszacharidról eltávolították az acetil- és benzil-védőcsoportokat, és a felszabaduló hidroxilokat szulfátszterekké alakítva eljutottak az idraparinux végtermékhez (**210**), amelyet Na-só

formájában izoláltak (82. ábra). Az uronsavakat diszacharid-szinten alakították ki, a szintézis legérdekesebb megoldása az volt, hogy valójában csak az L-iduronsavtartalmú **212** származékot állították elő monoszacharidokból, majd ebből nyerték egyetlen lépésben, C-5' helyzetű epimerizációval a **211** D-glükuronsav-tartalmú diszacharidot. Ez nagyon elegáns megoldás volt, de előtte hosszadalmas szintézisútra volt szükség az epimerizációra alkalmas vegyület (**212**) előállításához (83. ábra).



83. ábra. A GH diszacharid akceptor építőelem (**212**) szintézise

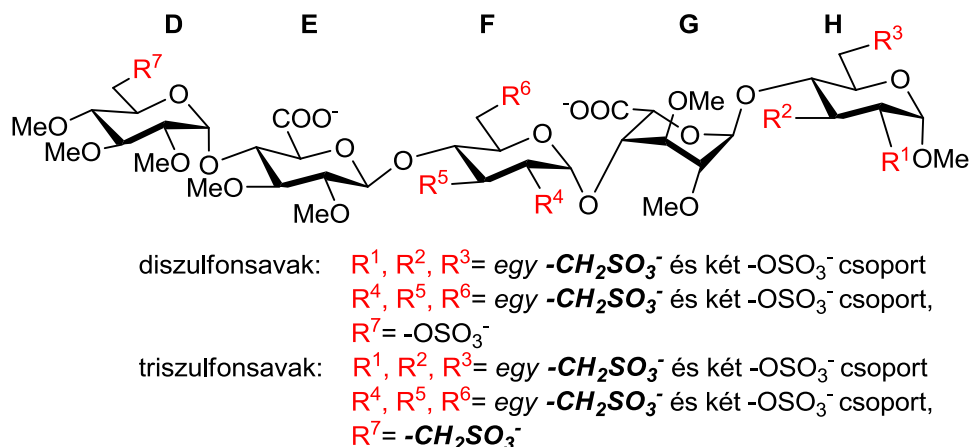
Látható, hogy már az L-idopiranoz építőelem (**217**) szintézise is hat lépést igényelt az ismert **216** D-glükofuranóz származékból kiindulva. A glikozil-fluoriddal végrehajtott glikozilezésnél (**217**+**218**) a 2-O-acetil résztvevőcsoporttal biztosították az 1,2-*transz*-glikozidkötés kialakulását. Az idopiranoz-tartalmú diszacharidon (**219**) először a szükséges 2'-metilétert alakították ki (→**220**), majd előkészítették a vegyületet az oxidációra (**221**). A teljesen védett diszacharidon Jones-oxidációval kialakították a 6'-karboxilcsoportot, majd metilészterré alakították, végül eltávolították a 4'-levulinoil védőcsoportot. A termékként kapott **212** származék egyrészt akseptorként szolgált a tetraszacharid szintéziséhez, másrészt ebből állították elő a D-glükuronsav-tartalmú diszacharidot (84. ábra).



#### 5.4. Az idraparinux bioizoszter szulfonsav-mimetikumainak szintézise – Saját eredmények<sup>170-176</sup>

Kutatócsoportunk a szénhidrát-szulfonsavak szintézisében szerzett tapasztalatok birtokában új típusú antitrombotikumok kifejlesztését határozta el. A heparin hatás-szerkezet összefüggéseinek vizsgálata során megállapították, hogy a szulfátészterek nem helyettesíthetők foszfátészter csoporttal és a karboxilcsoportok nem helyettesíthetők szulfátészterrel<sup>164,167</sup> - a szulfonsavakkal történő helyettesítést azonban nem vizsgálták. Úgy véltük, hogy a szulfátészterek bioizoszter szulfonsavakkal történő helyettesítése hatásos mimetikumokat eredményezhet. Van erre utaló irodalmi példa: mannóz-6-foszfátok bioizoszter foszfonsav és szulfonsav analogonjai hatékonyan kötődnek kation-független mannóz-6-foszfát receptorokhoz.<sup>177</sup>

Célkitűzésünk az volt, hogy a pentaszacharid-antitrombin kötődésben kulcsszerepet játszó szulfátésztereket ( $-OSO_3^-$ ) szisztematikusan bioizoszter szulfonátometil-csoportokkal ( $-CH_2SO_3^-$ ) helyettesítve di- és triszulfonsav-mimetikumokat állítsunk elő. Vezérmolekulának a legjobb antitrombotikus hatású és legegyszerűbben előállítható idraparinux pentaszacharidot választottuk. Az idraparinux összesen hét szulfátésztert tartalmaz, ezek közül két vagy három csoport helyettesítését terveztük, oly módon, hogy egy cukoregységen legfeljebb egy cserét hajtunk végre, a többi helyen pedig megtartjuk a szulfátészter csoportokat (53. ábra).



86. ábra. Az idraparinux bioizoszter szulfonsav mimetikumai, tervezett szerkezetek

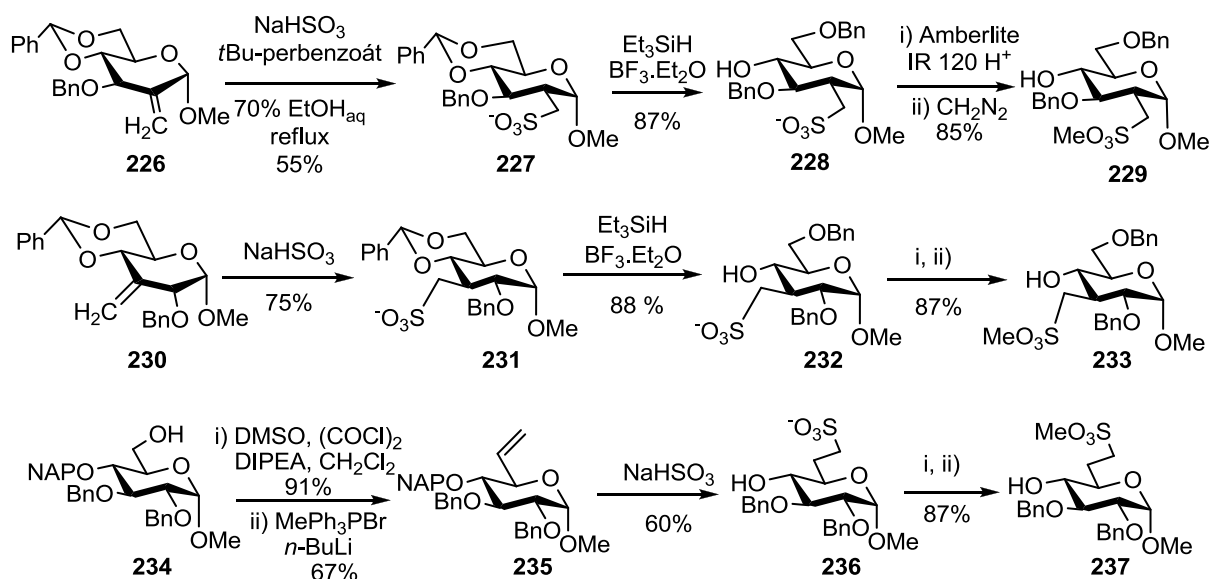
A heparinoidok szintézise során az egyik nehéz feladat az uronsavak beépítése az oligoszacharid láncba, ami alapvetően kétféle módon történhet. Az egyik megoldás, hogy monoszacharid-szinten állítják elő az uronsavakat, és ezeket használják fel építőelemként. A másik lehetőség, hogy megfelelő időz vagy glükóz egységet építik be az oligoszacharid-

láncba, és az uronsavvá oxidálást oligoszacharid-szinten hajtják végre. (A szakirodalomban a kétféle eljárásra a *pre-glycosidation oxidation* és a *post-glycosidation oxidation* megnevezés használatos).<sup>178</sup> Az első módszer hátránya, hogy a megfelelően védett uronsav, amely donorként vagy akceptorként használható, csak hosszadalmas védőcsoport-manipulációkkal állítható elő. A második módszernél több átalakítást kell elvégezni oligoszacharid-szinten, és az oligoszacharidon végzett oxidáció hatékonysága is kérdéses lehet. A szulfonsav-csoportokat monoszacharid-szinten kívántuk kialakítani, ám abban semmilyen tapasztalatunk nem volt, hogyan tudunk dolgozni szulfonsavat és uronsavat is tartalmazó oligoszacharidokkal. Ezért a nehézségek feltérképezése és a leghatékonyabb szintézis-stratégia megtalálása céljából először a célvegyület di- és triszacharid fragmentumait állítottuk elő.<sup>170-173</sup> Ezt követően a tervezett pentaszacharidok közül megvalósítottuk egy pentaszacharid-diszulfonsav ( $R^3=R^6=CH_2SO_3^-$ ) és egy pentaszacharid-triszulfonsav ( $R^3=R^6=R^7=CH_2SO_3^-$ ) szintézisét.<sup>174-176</sup> A következő részben ezt a munkát ismertetem.

#### 5.4.1. Az EF és GH diszacharid-fragmensek szulfonsav-mimetikumainak szintézise

Az oligoszacharidok szulfonsav-csoportjait monoszacharid-szinten kívántuk kialakítani, így első feladatunk a C-2, C-3 és C-6 helyzetben szulfonátometilezett és megfelelően védett glükóz akceptorok előállítása volt. A szulfonsavcsoport bevezetését szén-szén kettős kötésen végrehajtott  $NaHSO_3$  addícióval terveztük – ezt a reakciót a *H. pylori* adhézinak ligandum-analógjainak előállítása során már hasznosítottuk. Az addíciós lépés előtt Wittig-reakcióval előállítottuk az exometilén-csoportot tartalmazó **226**, **230** és **235** származékot. Ezután következett a szintézis kulcslépésének számító gyökös addíció, amely minden esetben kiváló regio- és sztereoselektivitással adta a várt szulfonsav-sókat (**227**, **231** és **237**, 87. ábra).<sup>170</sup>

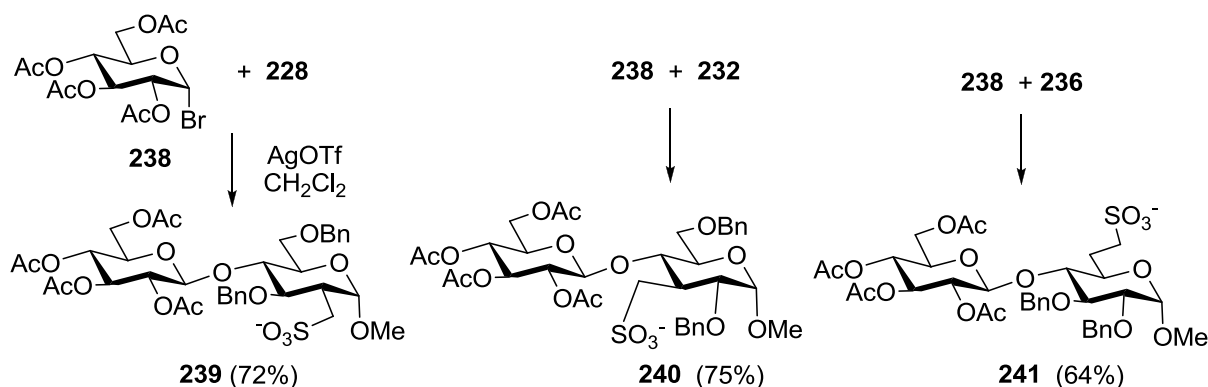




87. ábra Szulfonsav-tartalmú akceptorok szintézise

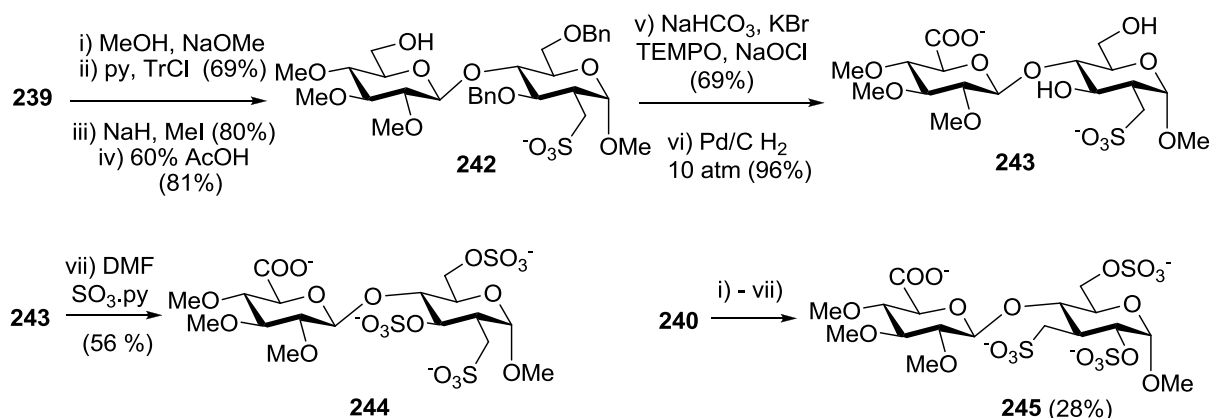
A 4,6-*O*-benzilidén-acetál tartalmú **227**-ből és **231**-ből trietilszilánnal végzett gyűrűnyitással képeztük az akceptor származékokat (**228** és **232**). A 6-dezoxi-6-szulfonátometil származék esetében a hidrogénszulfít-addíció körülményei között felszabadult a 4-es OH-csoport, így közvetlenül megkaptuk a glikozilezésre alkalmas **236** vegyületet. A kedvező mellékreakciót valószínűleg a *tert*-butil-peroxibenzoát katalizátornak köszönhetjük. A szulfonsav-sókból a sav felszabadítását követően diazometánnal végrehajtott metilezéssel szulfonsav-metilésztereket állítottunk elő (**229**, **233** és **237**).

Az **EF** diszacharidok glükuronsav egységeit glikozilezés utáni oxidációval kívántuk kialakítani, ezért az akceptorokat a D-glükózból két lépésben előállítható **238** glükózil-bromid donorral glikozileztük. A szulfonsavak Na-só formájában kiváló akceptoroknak bizonyultak, és jó hozammal eredményezték a kívánt **239-241** diszacharidokat (88. ábra).



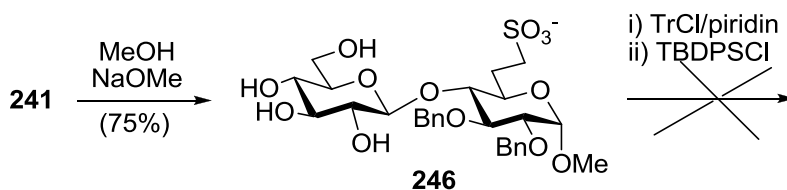
88. ábra. A szulfonsav-sók glikozilezése glükóz donorral

Közismert, hogy az uronsavak lúgos körülmények között  $\beta$ -eliminációra hajlamosak – modell reakciókban ezt magunk is tapasztaltuk<sup>171</sup> –, ezért a további átalakításokat úgy terveztük, hogy az uronsavak kialakítása után ne legyen szükség bázikus körülményeket igénylő lépésre. Tervünk az volt, hogy az oxidálandó 6'-OH csoportot tritil-éter formájában védjük, ezután kialakítjuk a 2'-, 3'- és 4'-helyzetű metilétereket, glükuronsavvá oxidáljuk az **E**-egységet, végül eltávolítjuk a benzil-védőcsoportokat és szulfatáljuk az **F**-egység két szabad hidroxilját. A **239** és **240** származékon ezt a reakciósort sikerrel végrehajtottuk, és jó hozammal izoláltuk a **244** és **245** diszacharid-szulfonsavat (89. ábra).



89. ábra. Metiléter-képzés majd oxidáció glükuronsavvá diszacharid-szinten

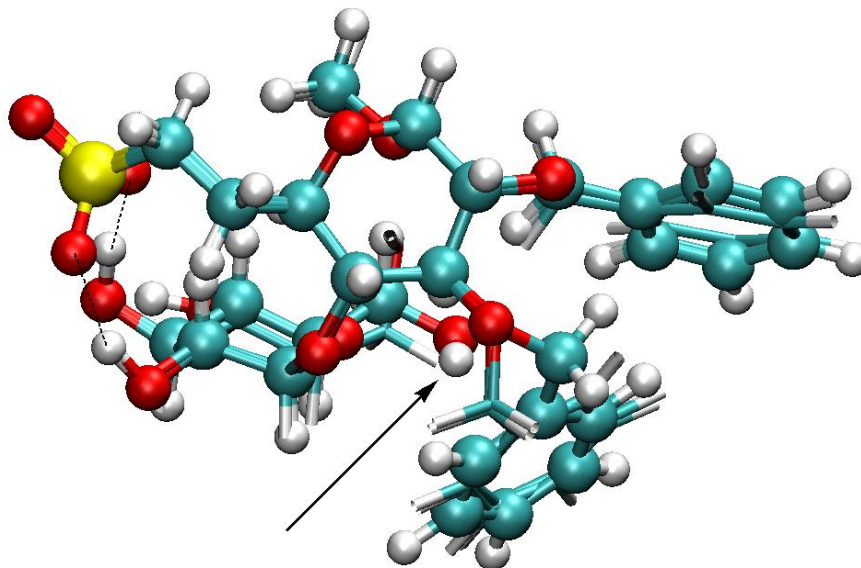
A 6-os helyzetű szulfonátometil-csoportot tartalmazó származék (**241**) dezacetilezését követően a 6'-hidroxilcsoport szelektív védelmét nem tudtuk megoldani. Meglepő módon a **246** vegyület sem a tritilezési, sem a szililezési reakcióban nem alakult át (90. ábra).



90. ábra. Kísérletek a 6-szulfonsavtartalmú diszacharid 6'-OH csoportjának szelektív védelmére

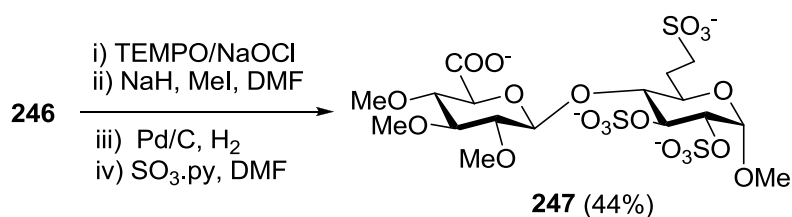
A reakciók sikertelenségére a magas hőmérsékletű molekuladinamikai szimulációk alapján végzett geometria-optimalizálási számítások adtak megmagyarázatot. A számítások szerint a legalacsonyabb energiájú konformációkban a 6'-hidroxilcsoport a szulfonsavtartalmú cukorgyűrű és annak két benzil-szubsztituense által alkotott üregben van, és így a nagyméretű reagensek nem tudják megközelíteni. A szokatlan konformációt valószínűleg a 6-os helyzetű szulfonsav-csoport és a 2'- és 3'-OH csoportok közötti H-hidak

stabilizálják (91. ábra). A H-hidas kölcsönhatásokat NMR mérésekkel igazoltuk: 2'- és 3'- helyzetben nagyon lassú volt a hidrogén-deutérium csere, a H-hidat nem létesítő 6'-OH deuterálása viszont azonnal végbement.<sup>171</sup>



91. ábra. A **246** diszacharid hat legalacsonyabb energiatartalmú konformációjának szuperpozíciója. Nyíl mutatja a 6'-OH csoportot.

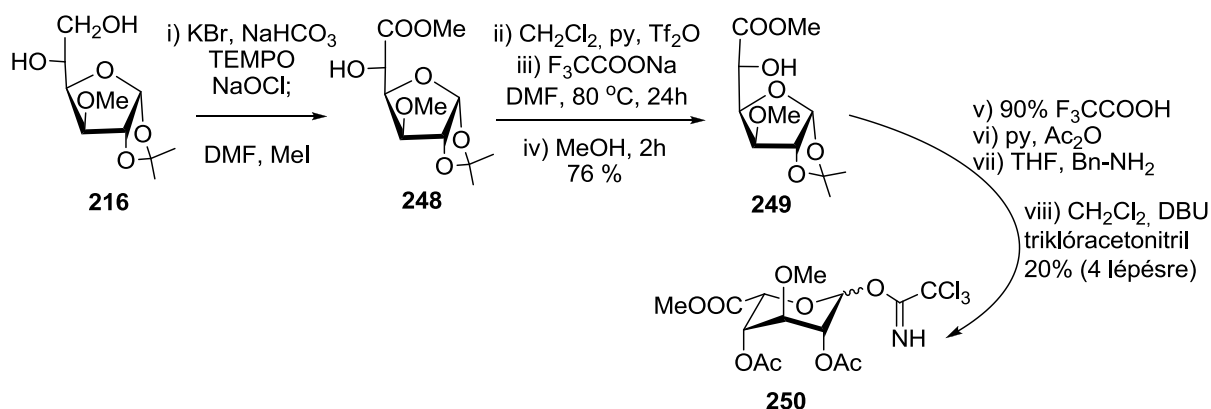
A molekuladinamikai vizsgálatokkal párhuzamosan megkíséreltük a **246** vegyületet egy új reakcióúton, közvetlen oxidációval, majd azt követő metilezéssel átalakítani a célvegyületté. Ezt a rövidebb szintézisutat korábban azért nem alkalmaztuk, hogy elkerüljük a bázikus körülményeket (így a metilezést), ami az uronsavrészen könnyen  $\beta$ -eliminációt eredményezhet.<sup>171</sup> A **246** tetrahydroxi-származékot katalitikus mennyiségű TEMPO reagens (TEMPO: (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil) és sztöchiometrikus mennyiségű nátrium-hipoklorit társ-oxidálószer együttes alkalmazásával szelektíven oxidáltuk.<sup>180</sup> Ezután következett a kritikus lépés, a glükuronsav három hidroxilcsoportjának metilezése. Szerencsére a bázikus körülmények ellenére nem történt elimináció, és végül elfogadható összhozammal izoláltuk a 6-szulfonátometil-tartalmú **247** diszacharidot (92. ábra).



92. ábra. A 6-szulfonátometil-tartalmú **EF** diszacharid előállítása

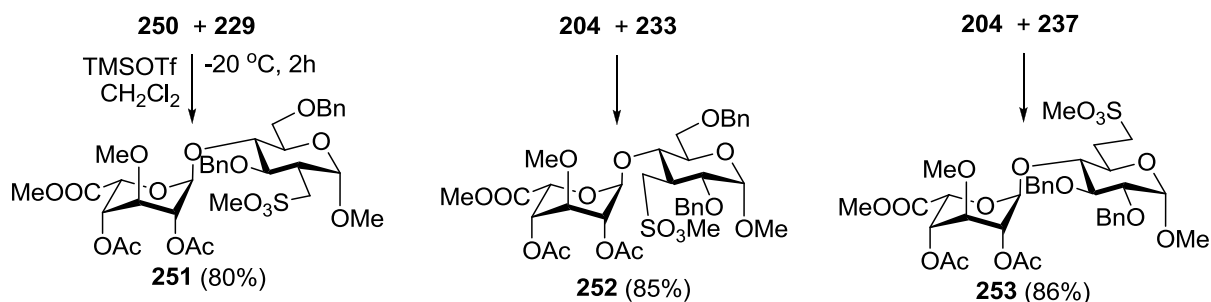
A glükuronsav-tartalmú **EF**-diszacharidok szintézise a diszacharid-szinten végzett uronsav-képzés miatt hosszadalmas volt. Az iduronsav-tartalmú **GH** diszacharidokat igyekeztünk rövidebb szintézisúton, iduronsav építőelem felhasználásával előállítani. Ez a „pre-glycosidation oxidation” stratégia itt azért is indokolt volt, mert a D-glükózzal ellentétben az L-idóz nehezen hozzáférhető (szabad formában ritkacukornak számít). Heparinoidok szintézise során akár L-idóz, akár L-iduronsav építőelemet alkalmaznak, általában mindkettőt D-glükózból kiindulva állítják elő (ami az L-idóz C5 epimerje), és az L-idóz szintézise is ugyanolyan hosszadalmas, mint az iduronsavé.<sup>179</sup>

A legjobban kidolgozott irodalmi eljárásokban célszerűen D-glükofuranóz a kiindulási anyag, mert ebben a formában az 5-ös hidroxilcsoport nem tagja a cukorgyűrűnek, így nukleofil helyettesítéssel könnyen elérhető a C-5 epimerizáció. Mi is egy ilyen eljárást alkalmaztunk: a **216** D-glükofuranózt először szelektív oxidációval glükuronsavvá alakítottuk ( $\rightarrow$ **248**), majd 4-*O*-triflátot keresztül a **249** L-iduronsavvá epimerizáltuk.<sup>179a</sup> Végül a furanóz formából a piranózgyűrűs formába való átmenetet követően acetilezéssel, majd az anomer távozócsoport szelektív kialakításával jutottunk el a **250** imidát donorhoz. (93. ábra). A szintézis gyenge pontja az, hogy a piranózgyűrű kialakulása nem hatékony, az 1,2-*O*-izopropilidén-csoport eltávolítása után a nyílt lánccú és gyűrűs tautomer formák egyensúlyi elegye alakul ki, amiben elég nagy arányban van jelen a nem hasznosítható furanóz forma is.



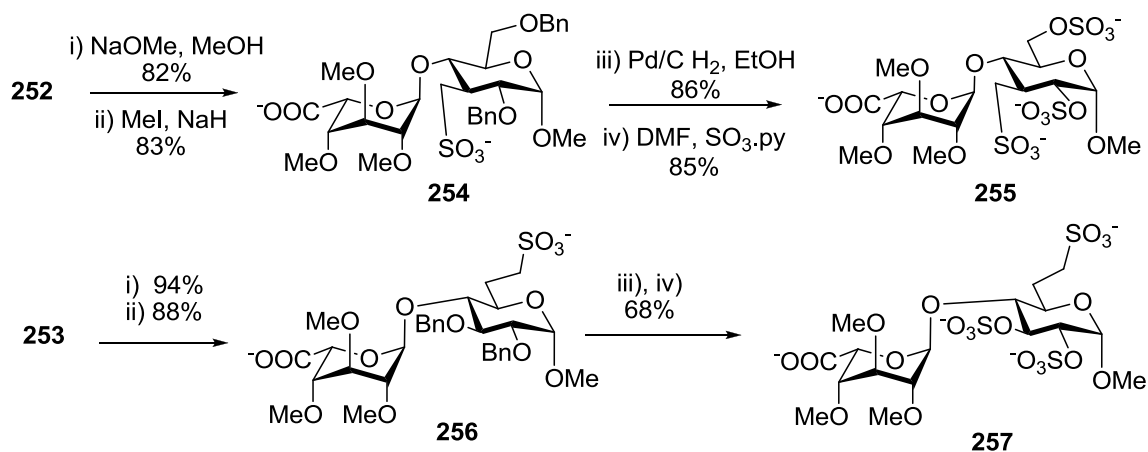
93. ábra. Az L-idopiranuronsav donor szintézise

A **250** iduronsav-donor és a só-formájú akceptorok glikozilezési reakciói eredménytelenek voltak, de a **229**, **233** és **237** szulfonsavészter származékok szerencsére kiváló akseptornak bizonyultak (94. ábra). A donor 2-es helyzetű résztvevő csoportja biztosította a reakciók sztereoselektivitását, így kiváló hozammal képződtek az 1,2-*transz* interglikozidos kötést tartalmazó diszacharidok (**251-253**).



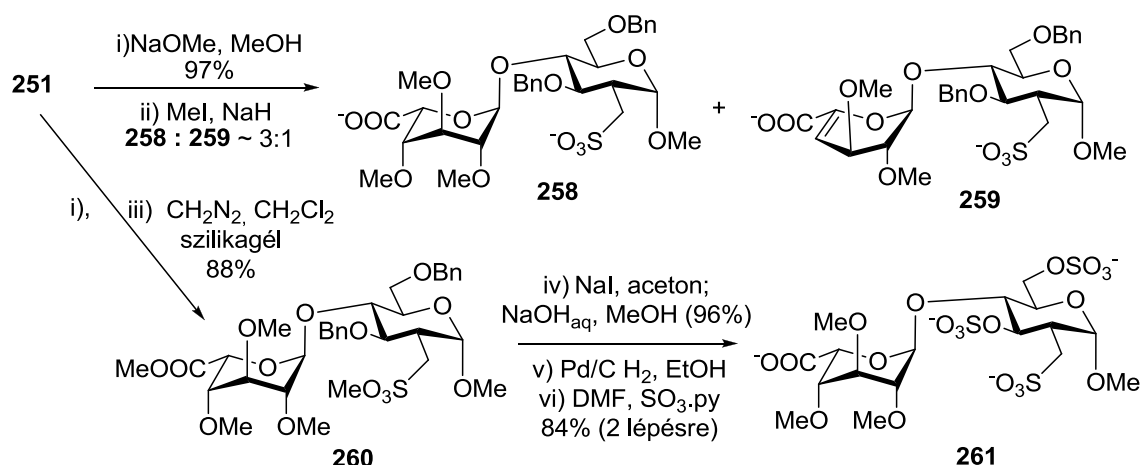
94. ábra. A szulfonsavészter akceptorok glikozilezése iduronsav donorral

A **252** és **253** vegyületekből dezacetilezés és metilezés után kiváló hozammal kaptuk a trimetilezett származékokat (**254**, **256**), amelyekből két lépésben eljutottunk az idraparinux **GH** fragmensének 3-dezoxi-3-szulfonátometil- (**255**) és a 6-dezoxi-6-szulfonátometil-analogonjához (**257**, 95. ábra).



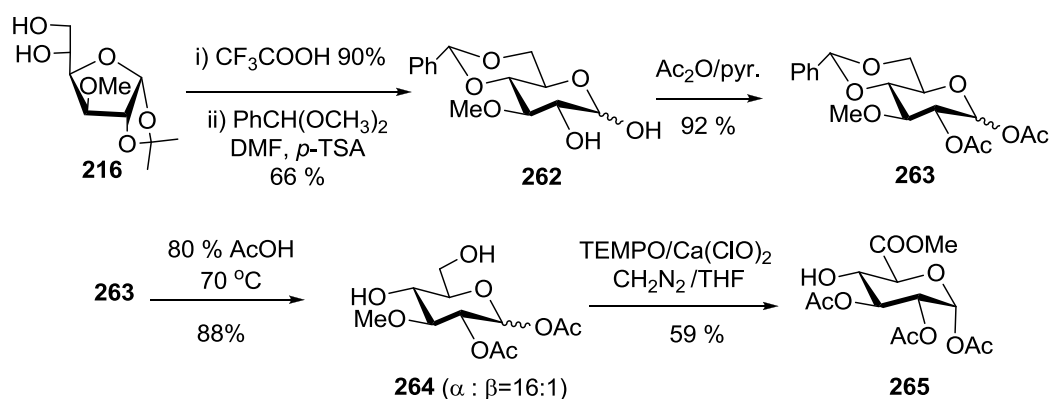
95. ábra. Az iduronsav-tartalmú diszacharidok átalakítása

A **251** 2-szulfonátometil-csoportot tartalmazó származék dezacetilezése után a NaH-del végrehajtott metilezési reakcióban azonban  $\beta$ -eliminációt tapasztaltunk, és a körülbelül 30%-ban képződött eliminációs terméktől (**259**) nem tudtuk megtisztítani a **258** trimetil-származékot (96. ábra). Az elimináció elkerülése céljából a bázikus körülményeket mellőztük, és a metilezést enyhén savas közegben, diazometánnal hajtottuk végre.<sup>181</sup> A szilikagél-katalizálta reakció több napot vett igénybe, de végül jó hozammal eredményezte a kívánt **260** származékot, amelyből sóképzés, katalitikus hidrogénezés és szulfatálás után kiváló hozammal nyertük a harmadik **GH** diszacharid-szulfonsavat (**261**).

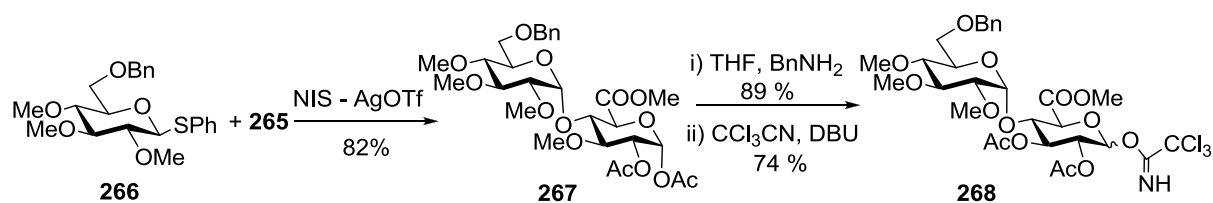
96. ábra. A 2-szulfonátometil-tartalmú **GH** diszacharid szintézise

#### 5.4.2. A DEF triszacharid-fragmens szulfonsav mimetikumainak szintézise

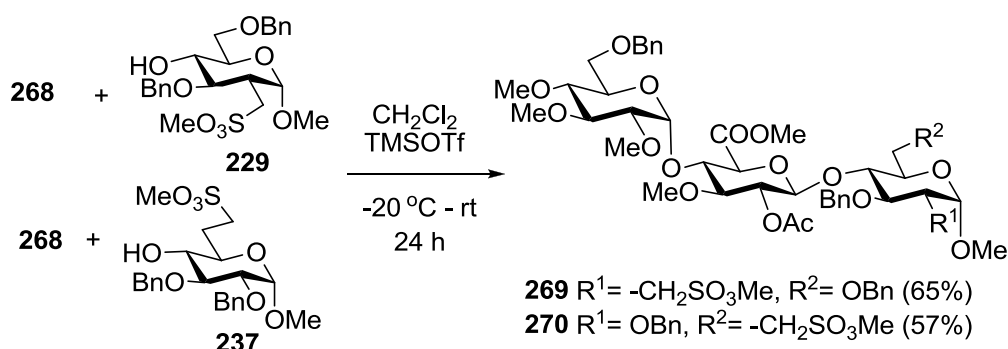
A **DEF** triszacharid szulfonsav analogonjainak szintézisét úgy terveztük, hogy egy közös **DE** donorral glikozilezzük a háromféle, 2-, 3- és 6-szulfonátometil tartalmú glikozil-akceptort (**229**, **233** és **237**). A **DE** donorhoz az **E**-egységet uronsav-akceptor formájában állítottuk elő a már korábban is alkalmazott **216** glükofuranóz származékból (97. ábra).

97. ábra Az **E** glükuronsav-akceptor építőelem szintézise

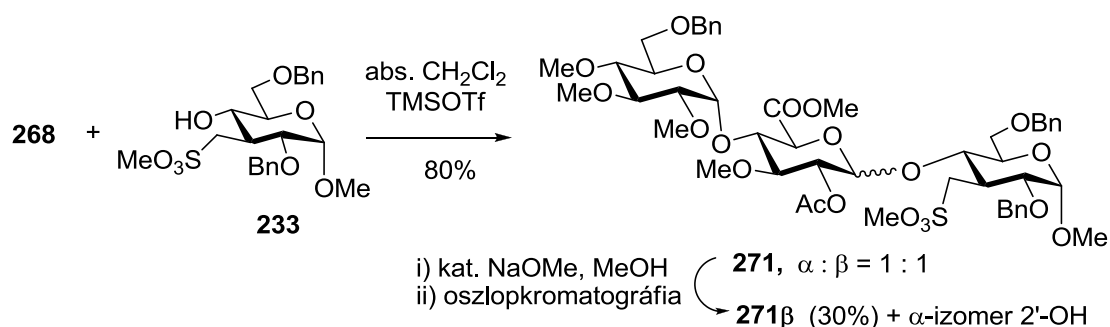
A **265** D-glükuronsavat az egyszerűen előállítható **266** feniltio-glükóziddal glikozilezve jó hozammal nyertük a kívánt **267** diszacharidot. A kiváló  $\alpha$ -szelektivitást a donor 2-es helyzetű nem-résztvevő csoportja, és az uronsav-akceptor kis reaktivitása együttesen eredményezte. A **267** diszacharidot két lépésben a **268** triklóracetimidát-donorra alakítottuk át (98. ábra).

98. ábra A **DE** diszacharid donor szintézise

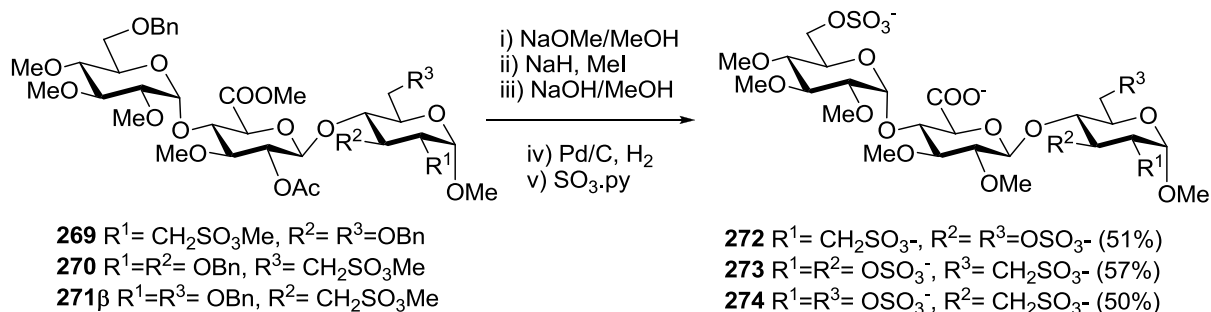
A **268** donorról glikozileztük a **229** és a **237** szulfonsav-tartalmú akceptorokat, és jó hozammal nyertük a triszacharidokat, a várt  $\beta$ -kötéssel az **E** és **F** egységek között (**269**, **270**, 99. ábra).

99. ábra A C-2 és C-6 szulfonátometil tartalmú akceptorok glikozilezése a **DE** donorról

A C-3-szulfonátometil akceptor (**233**) glikozilezése azonban meglepő eredményt hozott. A donor 2-es helyzetű résztvevő-csoportja nem biztosította a várt  $\beta$ -szelektivitást, a reakcióban 1:1 arányban alakult ki  $\alpha$ - és  $\beta$ -interglikozidos kötés. Valószínűleg a **233** akceptor  $\beta$ -oldalon lévő C-3 helyzetű szulfonátometil csoportja és a **222** uronsav-donor szintén  $\beta$ -oldali karboxilcsoportja közötti tasztítás eredményezte a sztereoszelektivitás teljes hiányát. A **271** anomerkeveréket sajnos nem tudtuk kromatográfiásan szétválasztani (100. ábra), de szerencsére a Zemplén-dezacetilezésnél jelentős reaktivitásbeli különbség mutatkozott az anomerek között, és az  $\alpha$ -anomer kemoselektív dezacetilezése után sikerült a szükséges **271 $\beta$**  származékot tiszta formában izolálnunk.

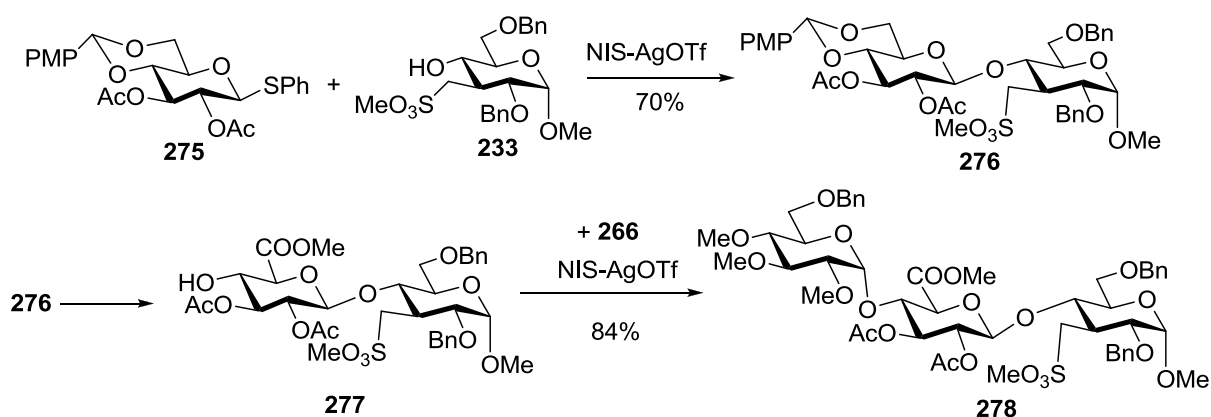
100. ábra. A C-3 szulfonátometil tartalmú akceptor glikozilezése a **DE** donorról

A dezacetilezés és metilezés, valamint a katalitikus hidrogénezést követő szulfatálás mindhárom triszacharidnál kiváló hozammal ment végbe, így sikeresen izoláltuk az idraparinux **DEF** triszacharid egységének három szulfonsav mimetikumát (**272-274**, 101. ábra).<sup>172</sup>



101. ábra. A **DEF** triszacharid szulfonsav-mimetikumai

A C-3-szulfonsavat tartalmazó származék (**274**) glikozilezésénél fellépő szelektivitási probléma megoldására kidolgoztunk egy új, **D+EF** kapcsoláson alapuló reakcióutat (102. ábra). Először egy nem-uronsav donort (**275**) alkalmazva jó sztereoszelektivitással előállítottuk a karboxil-funkciót nem tartalmazó **EF**-diszacharidot (**276**). Ezután az **E** egységről eltávolítottuk a *p*-metoxi-benzilidén védőcsoportot, majd szelektív oxidációval uronsavvá alakítottuk. Az így nyert **277** akceptort a korábban is alkalmazott **266** donorral glikozilezve jó összhozammal izoláltuk a **278** triszacharidot, amiből a szokásos átalakítások után eljutottunk a **274** triszacharidhoz.<sup>172,173</sup> Ez utóbbi szintézisút (**D+EF** kapcsolás) sokkal jobb hozammal eredményezte a C-3 szulfonátometil tartalmú **DEF** triszacharidot, mint az eredeti **DE+F** glikozilezés.



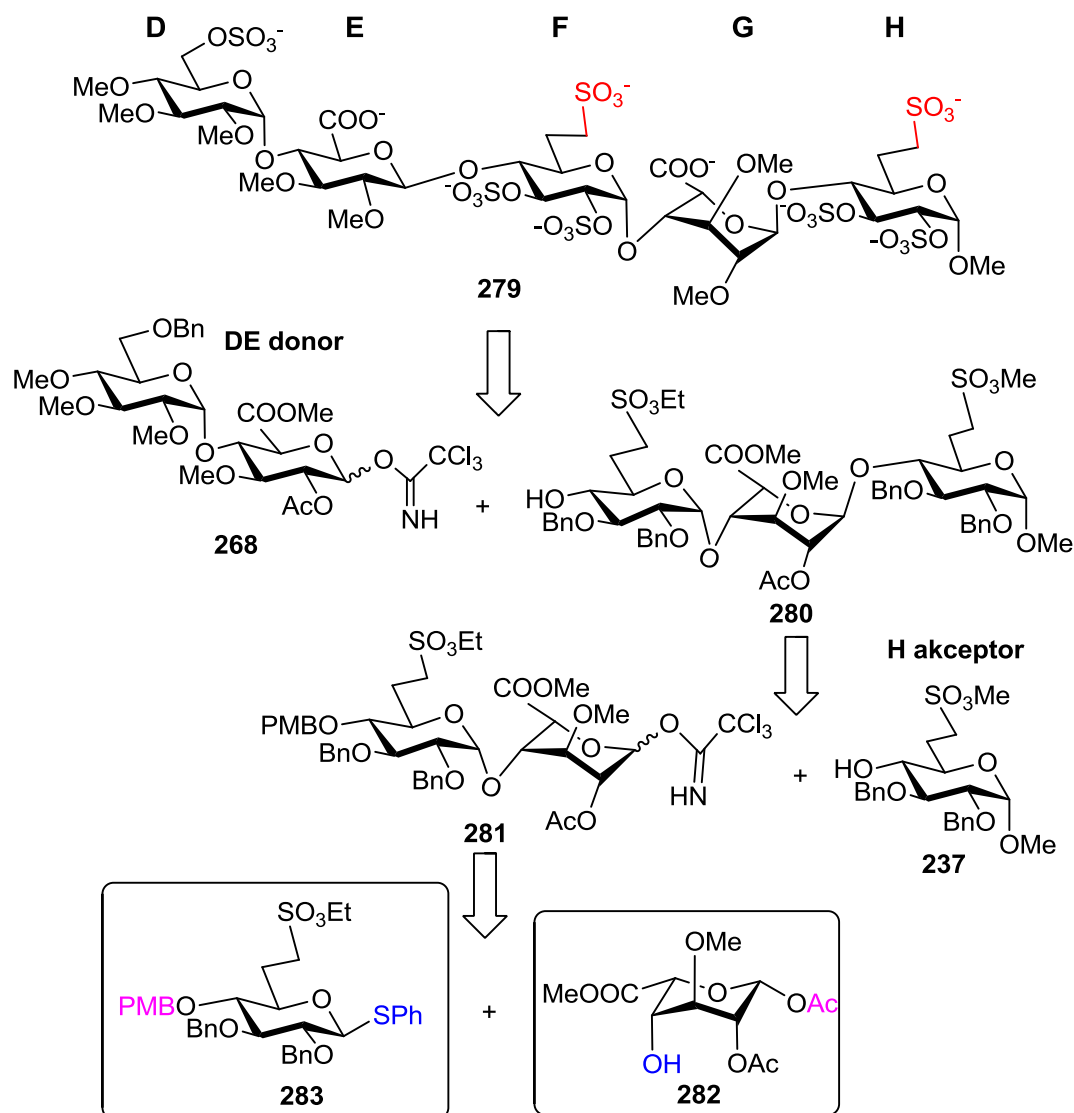
102. ábra. A C-3 szulfonátometil tartalmú **DEF** triszacharid új szintézise



### 5.4.3. Az idraparinux első szulfonsav mimetikumának szintézise<sup>174-176</sup>

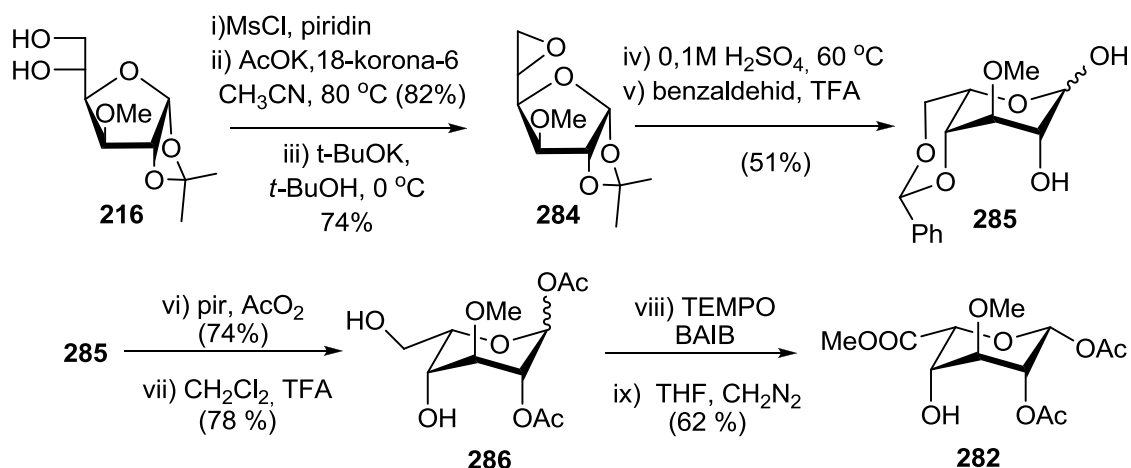
Az uronsav-tartalmú di- és triszacharid-szulfonsavak szintézise során összegyűjtött tapasztalatok birtokában hozzáláttunk az idraparinux bioizoszter szulfonsav-mimetikumainak szintéziséhez. Mivel a szulfonátometil-csoportok kialakítása legegyszerűbben primer helyzetben valósítható meg, ezért először olyan mimetikumok szintézisét terveztük meg, amelyekben a **H** és **G**, illetve az **E**, **H** és **G** egységek primer szulfátészter-csoportjai helyére építünk be bioizoszter szulfonsav helyettesítőt. Első pentaszacharid célvegyületünk, a **279** diszacharid-szulfonsav szintézise viszonylag egyszerűnek tűnt. A retroszintetikus analízisből látszik, hogy egy **DE+FGH** kapcsolat során alkalmazhatjuk a korábban előállított **268** donort, a **280** triszacharid építőelemhez pedig felhasználhatjuk a di- és triszacharidok szintézisében már alkalmazott **237** szulfonsav-tartalmú akceptort (103. ábra).

A tervezett szintézishez tehát mindössze két új építőelemet kellett előállítanunk, a **282** L-iduronsav akceptort, és a **283** szulfonsav-tartalmú glikozil donort. Mivel a két egység összekapcsolásával előállítandó **281** diszacharidot a pentaszacharid-lánc közepére kell beépíteni, ezért az iduronsav anomer pozíciójában, és a glükózid egység 4-es pozíciójában szelektíven eltávolítható védőcsoportokat kellett alkalmaznunk.



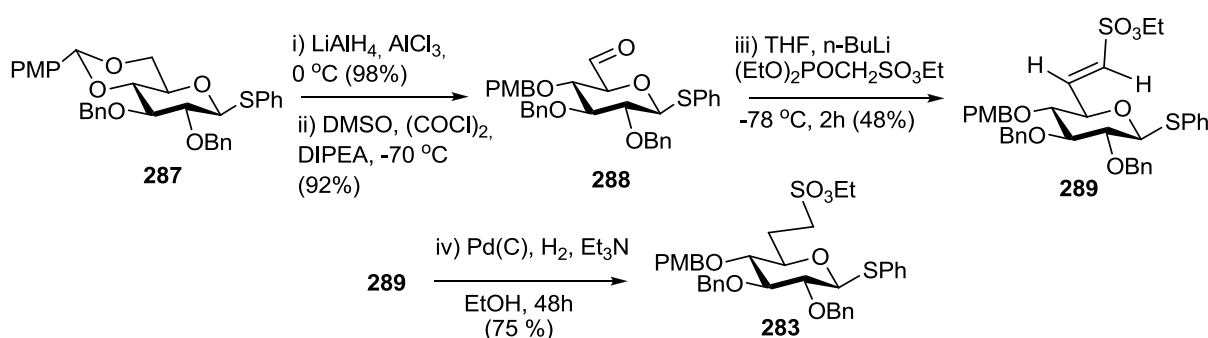
103. ábra. A **279** pentaszacharid-diszulfonsav retroszintetikus analízise

Az új L-iduronsav építőelemet irodalmi módszerek alapján szintetizáltuk (104. ábra).<sup>179b,g</sup> A **216** D-glükofuranózból nukleofil szubsztitúcióval előállítottuk az L-ido-konfigurációjú **284** epoxidot, amiből savas hidrolízist követően nyertük a piranózgyűrűs 4,6-O-benzilidén származékot (**285**). A szabad hidroxilokat acetileztük, majd eltávolítottuk a benzilidén-acetál védőcsoportot. A **286** 4,6-diolt szelektíven oxidáltuk katalitikus mennyiségű TEMPO és bisz-acetoxi-jódbenzol (BAIB) reagenssel,<sup>182</sup> majd az uronsavból metilésztert képeztünk, így nyertük a szabad 4-es hidroxilt tartalmazó akceptort. A **282** L-iduronsav-származék az anomer-helyzetben szelektíven eltávolítható acetilcsoportot tartalmaz, így a 4-OH csoportjának glikozilezése után könnyen donorrá alakítható.



104. ábra. Az L-iduronsav akceptor szintézise

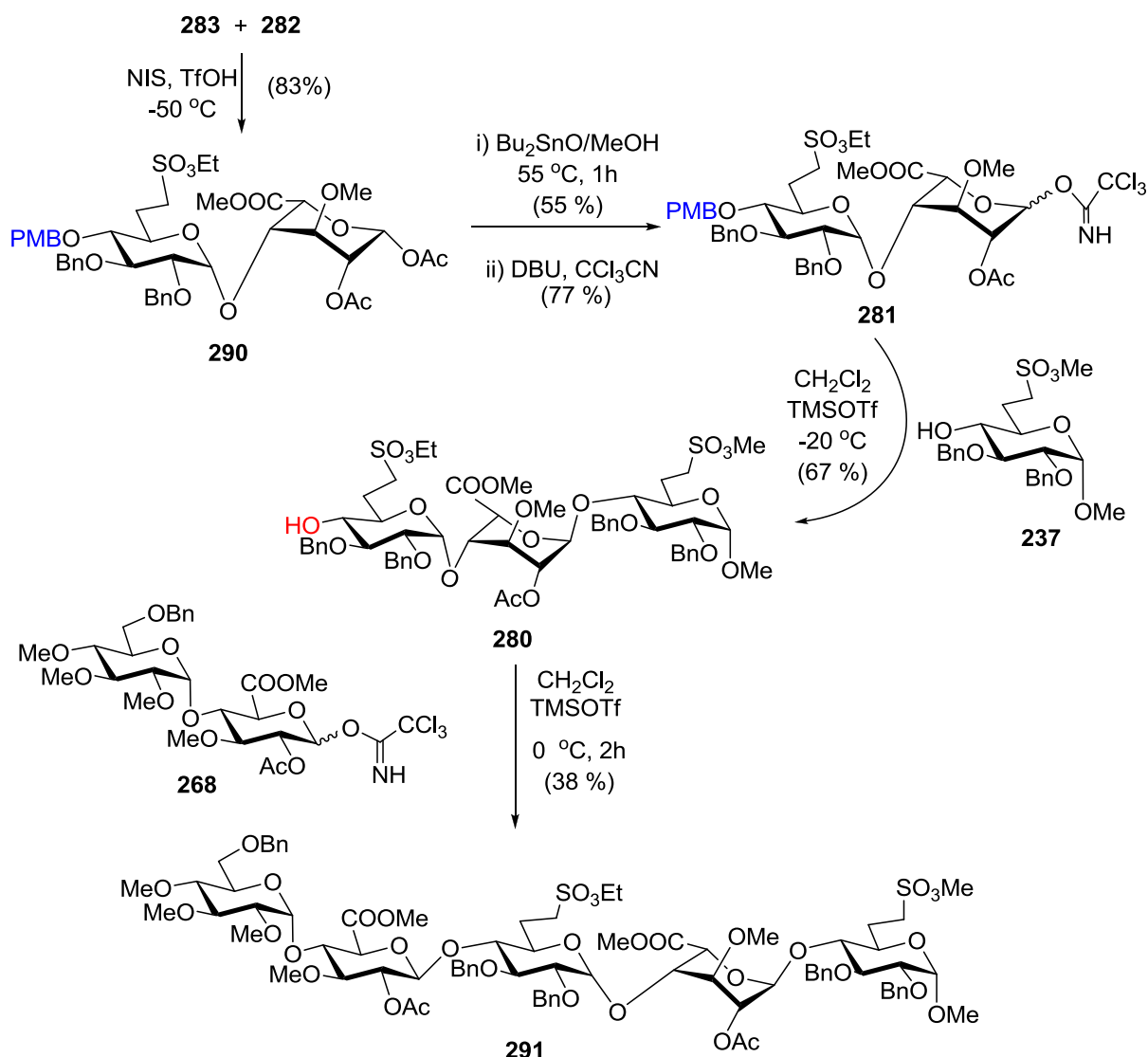
Az **283** tioglikozid donor szulfonátometil-csoportjának kialakítására a korábbi kétlépéses eljárás (Wittig-reakció, majd NaHSO<sub>3</sub>-addíció) nem volt alkalmas, mivel a szulfítaddíciót katalizáló *t*-Bu-perbenzoát a feniltio-aglikon oxidációját eredményezte volna. Modellreakciók alapján megfelelőnek tűnt a szulfonátometilén-származékot eredményező addíciós-eliminációs mechanizmusú Wadsworth-Horner-Emmons (WHE) reakció.<sup>177b,183</sup> A WHE-reakcióra alkalmas karbonilvegyületet a **287** molekulából állítottuk elő: a *p*-metoxibenzilidén-acetál regioszelektív redukciójával kapott 6-OH származékot Swern módszerrel oxidáltuk. Az így nyert **288** aldehidet dietilfoszfónáto-metánszulfonsav-etilészterrel reagáltatva előállítottuk a **289** telítetlen szulfonsavetilészter-származékot. A kizárólag (*E*)-izomer formában képződő olefinből bázis jelenlétében végrehajtott katalitikus hidrogénezéssel jutottunk el a **283** molekulához (105. ábra).



105. ábra. A 6-szulfonátometil tartalmú donor szintézise

A **283** tioglikozidot NIS-TfOH aktivátor jelenlétében reagáltattuk a **282** iduronsav akceptorral. A reakcióban kizárólag az α-interglikozidos kötést tartalmazó **290** diszacharid

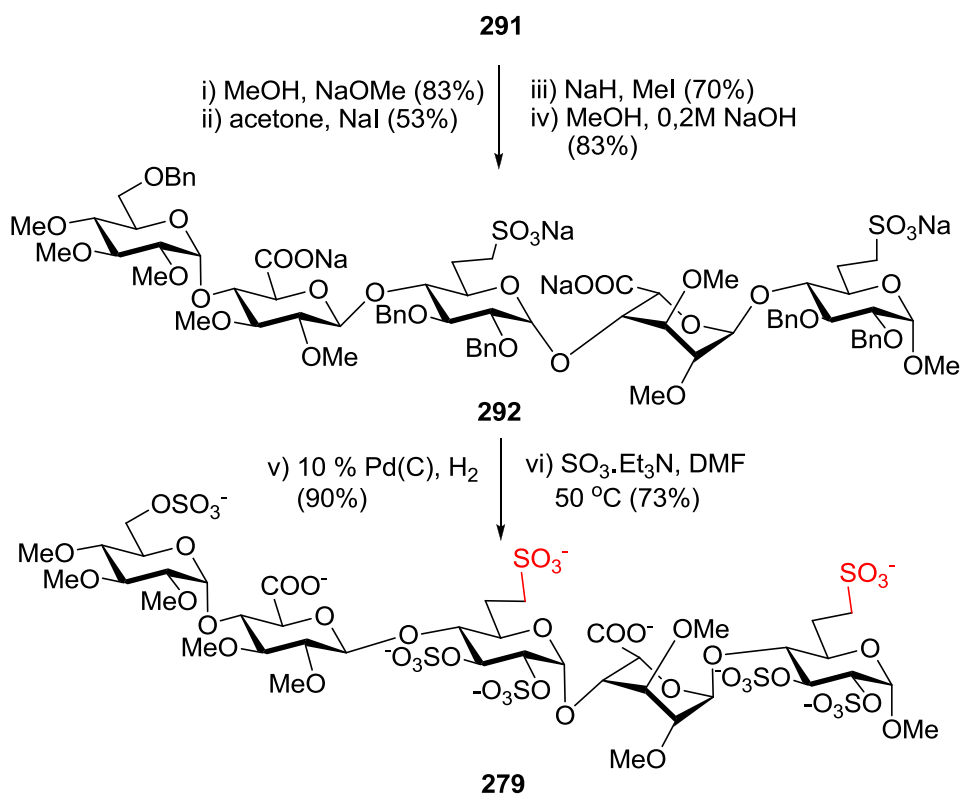
képződött, a kiváló  $\alpha$ -szelektivitás a donor 7-es helyzetű szulfonsavcsoportjának irányító hatásával magyarázható. A **290** diszacharidból két lépésben előállítottuk a **281** donort, amit TMSOTf promoter jelenlétében a szulfonsav-tartalmú **237** akceptorhoz kapcsoltunk. A reakcióban jó hozammal képződött a kívánt  $\alpha$ -interglikozidos kötést tartalmazó triszacharid, és egyúttal lehasadt az **F** egységről a lánchosszabbítási pozíciót védő *p*-metoxibenzil-csoport. Az így nyert **280** triszacharid akceptor és a **268** diszacharid donor reakciója 38%-os hozammal eredményezte a kívánt **291** pentaszacharidot (106. ábra). A mérsékelt hozamot valószínűleg az uronsav-tartalmú donor kis reaktivitása okozta.



106. ábra Az **FGH** akceptor szintézise, és összekapcsolása a **DE** donorral

Ezt követően Zemplén körülmények között eltávolítottuk az acetilcsoportokat, a szulfonsav-észtereket nukleofil szubsztitúciós reakcióban Na-sóvá alakítottuk, a szabad hidroxilcsoportokat NaH jelenlétében MeI-dal metileztük, majd lúgos közegben hidrolizáltuk

a karbonsav-metilésztereket. Az így nyert **292** származék benzil-védőcsoportjait katalitikus hidrogénezéssel eltávolítottuk, és a felszabaduló hidroxilcsoportokat  $\text{SO}_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$  komplex-szel szulfatáltuk. Ezzel sikeresen előállítottuk az idraparinux első bioizoszter szulfonsav-csoportokat tartalmazó mimetikumát, a **279** pentaszacharid-diszulfonsavat (107. ábra).

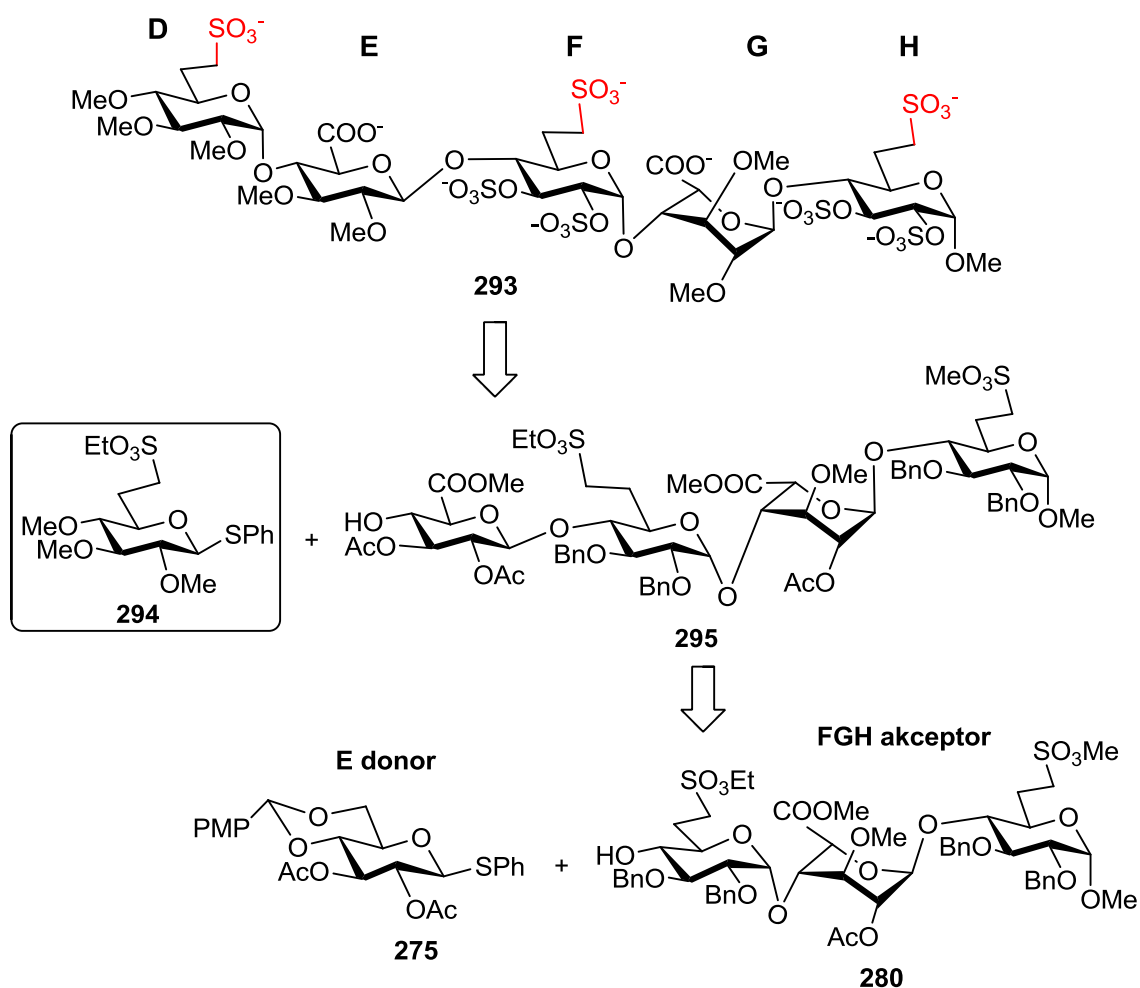


107. ábra. Az idraparinux diszulfonsav-mimetikuma

#### 5.4.4. Az idraparinux triszulfonsav mimetikumának szintézise<sup>175-176</sup>

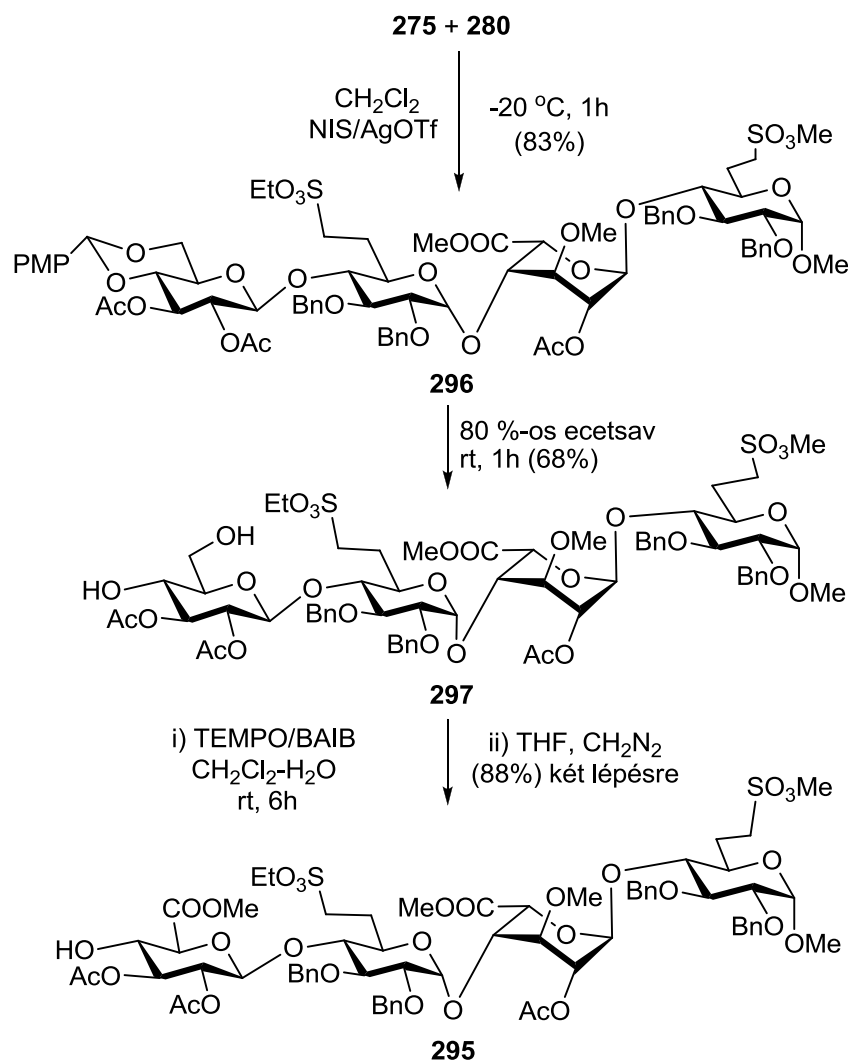
A **279** pentaszacharid-diszulfonsav szintézisének gyenge pontja a **268** glükuronsav-tartalmú donorral végzett [2+3] glikozilezés volt. A három szulfonsavcsoportot tartalmazó mimetikum szintézisének ezt a lépést mindenképpen el akartuk kerülni, ezért a 108. ábrán bemutatott retroszintetikus analízis alapján új reakcióutat terveztünk. A diszulfonsav-mimetikumhoz előállított **280** triszacharid-akceptort a **275** tioglikoziddal kívántuk glikozilezni – ezt a származékot korábban a 3-as helyzetű szulfonsavcsoportot tartalmazó **DEF** triszacharid szintézisében alkalmaztuk (lásd a 102. ábrát). Az **E** egység uronsavvá alakítását tetraszacharid-szinten terveztük, végül a két uronsavat és két szulfonátometil-csoportot tartalmazó tetraszacharid akceptor (**295**) és a **294** donor összekapcsolásával

kívántunk eljutni a célvegyülethez. Ehhez a szintézishez egyetlen új monoszacharid építőelemet, a **294** szulfonsavtartalmú tioglikozidot kellett előállítanunk.

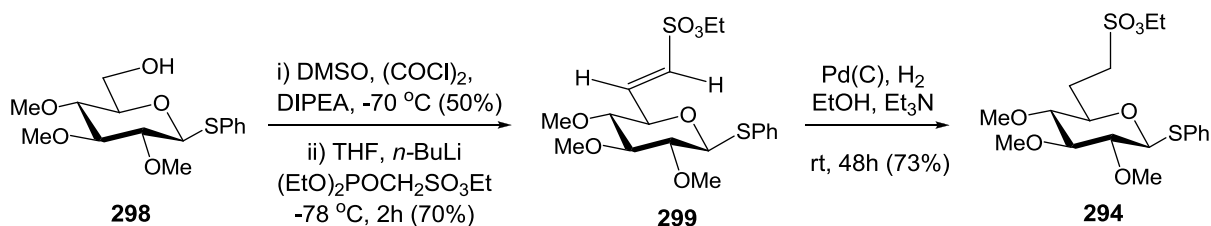


108. ábra. A **293** pentaszacharid-triszulfonsav retroszintetikus analízise

A **275** tioglikozidot NIS-AgOTf promoter jelenlétében hozzákapcsoltuk a **280** triszacharid-diszulfonsavhoz, és jó hozammal kaptuk a várt **296** tetraszacharidot. A teljesen védett tetraszacharidról savas hidrolízissel eltávolítottuk a *p*-metoxibenzilidén-csoportot (**297**), majd szelektíven oxidáltuk az **E** egység 6-os helyzetű hidroxilcsoportját, végül a keletkező karbonsav diazometánnal végzett észterezésével eljutottunk a **295** tetraszacharid akceptorhoz (109. ábra).

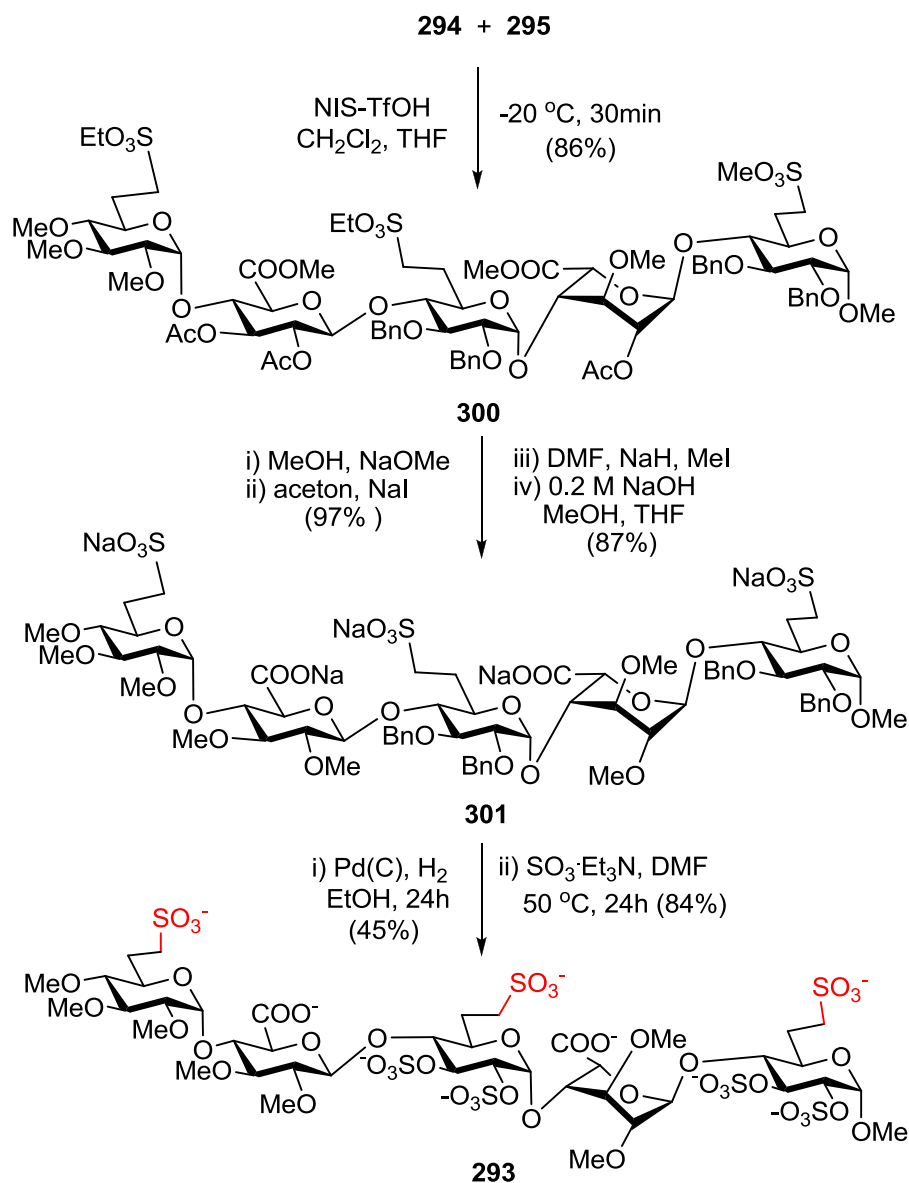
109. ábra. Az **EFGH** tetraszacharid akceptor szintézise

A szulfonsav-tartalmú **D** egységet a **298** tioglukozidból állítottuk elő az **F** építőelem szintézisével analóg módon. A mérsékelt hozamú oxidációs lépés után a Wadsworth-Horner-Emmons reakció jó hozammal eredményezte a szulfonsav-etilészter csoportot tartalmazó, (*E*)-geometriájú olefint (**299**), amit szelektív hidrogénezéssel alakítottunk át a **294** származékká (110. ábra).

110. ábra. A szulfonsav-tartalmú **D** egység szintézise

Ezt követően a **294** monoszacharid donort NIS/TfOH promoter jelenlétében

hozzákapcsoltuk a **295** tetraszacharid akceptorhoz. A donor megfelelő reaktivitást mutatott, és 7-es helyzetű szulfonsavészter csoportja ezúttal is biztosította a glikozilezés  $\alpha$ -szelektivitását, így 86%-os hozammal tudtuk izolálni a kívánt, három szulfonsav-csoportot tartalmazó **300** pentaszacharidot (111. ábra).



111. ábra. A pentaszacharid-triszulfonsav szintézise

A **300** pentaszacharid átalakítása a szokásos reakcióúton történt. Zempléndezacetilezés után lúgos körülmények között kialakítottuk a metilétereket – eliminációt ebben az esetben sem tapasztaltunk –, majd a karbonsavésztereket nátrium-sóvá alakítottuk (**301**), végül a benzil-éterek katalitikus hidrogenolízise után a felszabadult hidroxilcsoportokat SO<sub>3</sub>·Et<sub>3</sub>N komplex-szel észterestítettük. Így sikeresen előállítottuk az idraparinux újabb



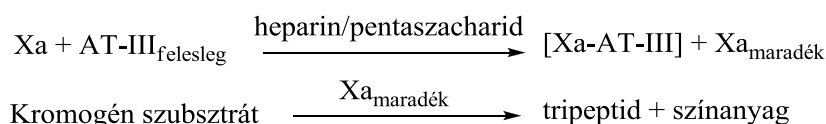
bioizoszter mimetikumát, a mindhárom glükóz egység 6-os helyzetében szulfonátometil-csoportot tartalmazó **293** pentaszacharid-triszulfonsavat (111. ábra).

A két szulfonsavtartalmú pentaszacharid szintézisét összehasonlítva érdemes megjegyezni, hogy a **293** triszulfonsav előállítása jóval hatékonyabbnak bizonyult, annak ellenére, hogy a szulfonsavtartalmú **D** egység szintézise plusz-lépéseket igényelt. A **279** diszulfonsavhoz mindkét uronsav egységet monoszacharid-szinten állítottuk elő, majd [2+3]-as blokk szintézist alkalmaztunk, így a teljes reakciósor 53 lépést igényelt glükóz és metil- $\alpha$ -D-glükopiranozid építőelemekből. A glükuronsav-tartalmú **DE** diszacharid donorral végzett 3+2 kapcsolás a donor kis reaktivitása miatt nem volt hatékony, és csak 38%-os hozammal eredményezte a kívánt pentaszacharidot. A **293** pentaszacharid-triszulfonsav szintéziséhez választott [1+1+3]-as kapcsolási stratégia során valamennyi glikozilezési lépés kiváló hozammal ment végbe, csakúgy, mint a D-glükuronsav egység tetraszacharid-szinten történő kialakítása. A hatékonyságot tovább növelte, hogy „megspóroltuk” a glükuronsav építőelem hosszadalmas előállítását, így a teljes szintézishez elegendő volt 50 lépés.

A szulfonsavtartalmú mimetikumok szintézisével párhuzamosan előállítottuk az idraparinux pentaszacharidot is, hogy a véralvadásgátlási vizsgálatoknál referencia-vegyületként felhasználhassuk. A szintézisre két új, az irodalmi módszerekkel versenyképes szintézisutat dolgoztunk ki,<sup>176</sup> ezt a munkát a terjedelmi korlátok miatt nem ismertetem.

#### 5.4.5. A pentaszacharid-szulfonsavak véralvadásgátló hatásának vizsgálata

A heparinoid pentaszacharidok antitrombotikus hatása abból származik, hogy közvetett úton, az antitrombin-III aktiválásával gátolják a véralvadási kaszkád egyik szerin-proteázát, a Xa faktort. Ezért az általunk előállított pentaszacharid-szulfonsavak véralvadásgátló hatásának meghatározása céljából megmértük a vegyületek Xa faktor-gátlási értékeit. A méréseket a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetével együttműködve végeztük el Siemens BCS® XP SYSTEM műszeren, Berichrom® Heparin módszerrel, humán vérplazma felhasználásával (112. ábra). A teszt inkubációs fázisa alatt a Xa faktor irreverzibilis komplexet képez az AT-III faktorról, így inaktiválódik. Az inkubációs fázis után szabadon visszamaradt, aktív Xa faktor mennyisége kromogén szubsztrát segítségével határozható meg. Az Xa-AT-III komplex kialakulását katalizálja a mintához adott heparinoid pentaszacharid.



112. ábra. A véralvadásgátlás meghatározásának módszere

A vizsgálatok során meghatároztuk a kereskedelmi forgalomból beszerzett fondaparinux, valamint az általunk előállított idraparinux (**210**) és a két szulfonsav-tartalmú pentaszacharid (**279**, **293**) heparinhoz viszonyított fajlagos anti-Xa aktivitását (3. táblázat).

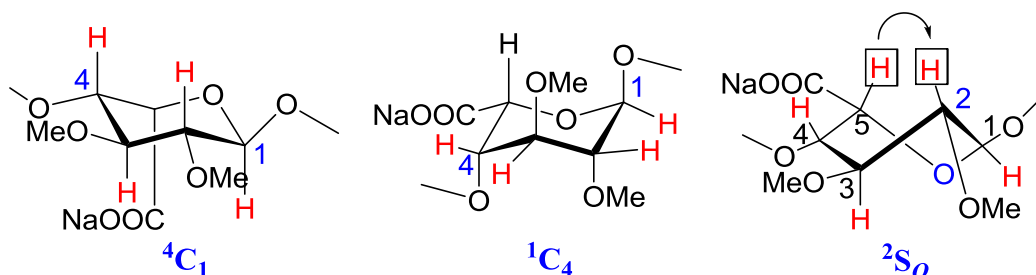
	Anti-Xa aktivitás (U/mg)
<b>fondaparinux</b>	1031
<b>idraparinux (210)</b>	1733
<b>pentaszacharid-diszulfonsav (279)</b>	2003
<b>pentaszacharid-triszulfonsav (293)</b>	485

3. táblázat. A pentaszacharidok anti-Xa aktivitása

A táblázat adataiból jól látható, hogy az **E** és **F** egység 6-os helyzetében levő szulfátészter-csoportok helyettesítése szulfonátometil-csoporttal (**279**) a véralvadásgátló hatás szempontjából kedvezőnek bizonyult: a pentaszacharid-diszulfonsav jobban gátolta a Xa faktort, mint az eddig ismert legjobb véralvadásgátló hatású oligoszacharid, az idraparinux. Ugyanakkor a **D** egység 6-os helyzetében is szulfonátometil-csoportot tartalmazó **293** triszulfonsav kb. négyszer gyengébb Xa-gátló hatást mutatott, mint az idraparinux, tehát a harmadik szulfonsav-csoport kialakítása jelentősen lerontotta a biológiai aktivitást.

Feltételezésünk szerint a két vegyület biológiai aktivitásában mutatkozó jelentős különbség konformációs okokra vezethető vissza. A heparinoid pentaszacharidok hatás-szerkezet vizsgálataiból tudjuk, hogy az antitrombotikus aktivitáshoz nélkülözhetetlen az iduronsav egység konformációs flexibilitása, mivel a pentaszacharid-AT-III komplex kialakulásához az iduronsav egységnek  ${}^2S_O$  csavart kád konformációban kell lennie.<sup>164,184,185</sup> (Az iduronsavnak nincs egyetlen kitüntetett konformációja, a  ${}^4C_1$ ,  ${}^2S_O$  és  ${}^1C_4$  konformerek energiatartalma nagyon hasonló.<sup>186</sup>) A hatás-szerkezet vizsgálatokból az is ismert, hogy a gátló hatással rendelkező pentaszacharidokban az iduronsav egység szabad formában is döntően  ${}^2S_O$  konformációban van, ennek a konformációnak a dominanciáját a szomszédos

cukorgyűrűkön levő szulfátészter-csoportok okozzák. Az iduronsav-egység konformációs viszonyaira a proton-proton csatolási állandó értékekből nyerhető információ. A 113. ábra táblázata tartalmazza az általunk előállított származékok **G** egységének jellemző csatolási állandóit, valamint a rögzített konformációjú származékokra az irodalomban megadott csatolási állandó értékeket.<sup>185</sup> Az adatokból jól látszik, hogy az idraparinux és a **279** diszulfonsav **G** gyűrűje  ${}^2S_0$  konformációban van. További bizonyítéku szolgált a **279** származéknál, hogy a ROESY spektrumban sikerült beazonosítani egy keresztcsúcsot a **G** egység 2-es és 5-ös protonja között – ezek a protonok csak a  ${}^2S_0$  konformációban vannak közel egymáshoz. A **293** triszulfonsav csatolási állandói viszont egyértelműen azt mutatják, hogy a  ${}^2S_0$  konformerek populációja nem jelentős.



Irodalmi csatolási állandók ( ${}^3J_{H,H}$ , Hz)				Mért csatolási állandók ( ${}^3J_{H,H}$ , Hz) ( <b>G</b> egység)		
${}^4C_1$	${}^1C_4$	${}^2S_0$		idraparinux <b>210</b>	diszulfonsav <b>279</b>	triszulfonsav <b>293</b>
$J_{1,2}$	7,8	0,0	2,8	2,6	2,8	3,6
$J_{2,3}$	9,0	3,7	5,3	5,5	5,1	~8-9
$J_{3,4}$	9,5	5,5	3,5	2,2	3,1	~2-3

113. ábra. Az iduronsav egységek szerkezete és csatolási állandói

Azt egyelőre nem tudjuk, hogy vajon önmagában a **D**-egységen lévő szulfonsav vagy a három szulfonsav-csoport együttesen felelős a konformáció jelentős megváltozásáért, és a biológiai hatás leromlásáért. További hatás-szerkezet összefüggések meghatározása céljából folyamatban van újabb pentaszacharid szulfonsavak szintézise, antitrombinnal való kölcsönhatásuk részletes műszeres vizsgálata és biológiai aktivitásuk meghatározása.

## 6. Összefoglalás

A doktori értekezésben feltételeztem immunstimuláló, növényi arabinogalaktán-oligoszacharidok szintéziséről, valamint a humán szervezet szabályozási folyamataiban kulcsszerepet játszó anionos szénhidrátok szulfonsav-mimetikumainak előállításáról számoltam be. Az elvégzett munka legfontosabb eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

### 6.1. Növényi eredetű arabinogalaktánok szintézise

Egyszerű és hatékony eljárást dolgoztunk ki nagy farmakológiai aktivitású (1-6)- $\beta$ -D-galaktán alapvázú, 2-es helyzetben  $\alpha$ -L-arabinofuranozil elágazást hordozó növényi arabinogalaktánok kémiai szintézisére. A ciklikus izopropilidén-acetál és (metoxidimetil)metil vegyes acetál védőcsoportkombináción alapuló eljárással di- és trigalaktán építőelemeket állítottunk elő, majd ezek felhasználásával különböző hosszúságú galaktán alapvázak moduláris szintézisét valósítottuk meg. Az ortogonális védőcsoportokkal ellátott galaktánokból változatos szerkezetű, 3-9 monoszacharidból felépülő mono- és diarabinózilezett arabinogalaktánokat állítottunk elő.

### 6.2. Sziálsav-tartalmú lektin ligandumok szulfonsav mimetikumainak szintézise

Védett aldonsavlaktonokból karbanion addíciós reakcióban 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil származékokat állítottunk elő, amelyek a biológiailag rendkívül jelentős ulóz-2-onsavak szulfonsav analogonjai. Az anomer szulfonsav-tartalmú származékokat glikozil donorként alkalmazva előállítottuk a gyulladásgátló szialil Lewis X tetraszacharid több szulfonsav mimetikumát.

A gyomorfekélyt okozó *Helicobacter pylori* megtelepedését gátló antiadhéziós terápia kidolgozása céljából szulfonsavmetil-tartalmú laktozidokat állítottunk elő exometilén származékon végrehajtott hidrogénszulfít-addícióval.

### 6.3 Véralvadásgátló hatású oligoszacharid szulfonsavak szintézise

Di- és triszacharid építőelemeket szintetizáltunk a véralvadásgátló hatású idraparinux pentaszacharid bioizoszter szulfonsav-mimetikumainak előállítása céljából. E munka keretében szulfonsavmetil tartalmú glikozil-akceptorokkal tanulmányoztuk szulfonsav-sók és szulfonsav-észterek glikozilezési reakcióit, és elsőként állítottunk elő uronsav-szulfonsav-tartalmú oligoszacharidokat.

Előállítottuk egy szintetikus antikoaguláns pentaszacharid (idraparinux) két szulfonsav

mimetikumát, amelyekben két vagy három glükóz egység 6-*O*-szulfát-csoportját metánszulfonsav-csoportra cseréltük. A szulfonsav mimetikumok szintézisével párhuzamosan az idraparinuxot is előállítottuk, hogy a biológiai vizsgálatokhoz referencia molekulaként alkalmazhassuk.

Humán plazmán végzett *in vitro* vizsgálattal meghatároztuk az általunk előállított molekulák véralvadásgátló hatását. Megállapítottuk, hogy mindkét szulfonsav-tartalmú pentaszacharid gátolja a véralváadási Xa faktort, ezzel elsőként bizonyítottuk, hogy a szulfátészter-csoportok helyettesíthetők bioizoszter szulfonsav-csoportokkal a specifikus Xa-gátló hatás elvesztése nélkül. A két szulfonsavszármazék jelentős aktivitásbeli különbségéből az is kiderült, hogy a biológiai aktivitás szempontjából alapvető fontosságú a beépített szulfonsavcsoportok helyzete és száma.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Lipták, A., Pintér I., Somsák, L.: Szénhidrátkémiai kutatások Magyarországon, *Magy. Kém. Foly.* **108** (2002) 467–491.
2. Antus, S.: Biológiaiilag aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között, III. rész, *Acta Pharmaceutica Hung.* **80** (2010) 3–17.
3. Varki, A.: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiol.* **3** (1993) 97–130.
4. Somsák, L., Vágvolgyiné Tóth, M.: Az élet megfejtésre váró titkosírása, a szénhidrátkód, *Magy. Kém. Lap.* **64** (2009) 233–239.
5. Paulsen, H.: Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **21** (1982) 155–173.
6. Fügedi, P., Garegg, P. J., Lönn, H., Norberg, T.: Thioglycosides as glycosylating agents in oligosaccharide synthesis, *Glycoconjugate J.* **4** (1987) 97–108.
7. Schmidt, R. R., Kinzy, W.: Anomeric oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **50** (1994) 21–123.
8. Garegg, P. J.: Thioglycosides as glycosyl donors in oligosaccharide synthesis, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **52** (1997) 179–205.
9. Davies, B. G.: Recent developments in oligosaccharide synthesis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2000, 2137–2160.
10. Oscarson, S.: Thioglycosides, *Carbohydrates in chemistry and biology*, Part I: Chemistry of saccharides (szerkesztők: Ernst, B., Hart, G. W., Sinaÿ, P), Wiley-VCH, 2000, 93–116.
11. Jensen, K. J.: O-Glycosylations under neutral or basic conditions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2002, 2219–2233.
12. Zhu, X., Schmidt, R. R.: New principles for glycoside-bond formation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** (2009) 1900–1934.
13. Fügedi, P.: Glycosylation methods, *The organic chemistry of sugars* (szerkesztők: Levy, D. A., Fügedi, P.) CRC Press, 2006, 89–179.
14. Fügedi, P.: Oligosaccharide synthesis, *The organic chemistry of sugars* (szerkesztők: Levy, D. A., Fügedi, P.) CRC Press, 2006, 181–221.
15. Huang, X., Wang, Z.: Strategies in oligosaccharide synthesis, *Comprehensive Glycoscience I*, (főszerkesztő: Kamerling, J. P.) Elsevier Science, 2007, 379–413.
16. Zhang, Z., Ollmann, I. R., Ye, X.-S., Wischnat, R., Baasov, T., Wong, Ch.-H.: Programmable one-pot oligosaccharide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 734–753.
17. Sears, P., Wong, Ch.-H.: Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins, *Science*, **291** (2001) 2344–2350.
18. Pante, O. J., Palmacci, R., Seeberger, P. H.: Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides, *Science*, **291** (2001) 1523–1527.
19. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1991.
20. Kociensky, P. J. *Protecting Groups*; Georg Thieme: Stuttgart, 2004
21. Gelas, J.: The reactivity of cyclic acetals of aldoses and aldosesides, *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **39** (1981) 71–156.
22. Oscarson, S.: Protective group strategies, *The organic chemistry of sugars* (szerkesztők: Levy, D. A., Fügedi, P.) CRC Press, 2006, 53–87.

23. Bajza, I., Borbás, A., Lipták, A.: Protecting group manipulations in carbohydrate synthesis, *Comprehensive Glycoscience I*, (főszerkesztő: Kamerling, J. P.) Elsevier Science, 2007, 203–259.
24. Grindley, T. B.: Applications of tin-containing intermediates to carbohydrate chemistry, *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **53** (1998) 17–142.
25. Rudd, P., M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I., A., Dwek, R., A.: Glycosylation and the Immune System, *Science* **291** (2001) 2370–2376.
26. a) Dwek, R. A.: Glycobiology: Toward understanding the function of sugars, *Chem. Rev.* **96** (1996) 683–720. b) Davis, A. P., Wareham, R. S.: Carbohydrate recognition through noncovalent interactions: A challenge for biomimetic and supramolecular chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38** (1999) 2978–2996.
27. Hanessian, S., Huynh, H. K.: Solution and solid phase *p*-alkoxybenzylation of alcohols under neutral conditions, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 671–674.
28. Xia, J., Abbas, S. A., Locke, R. D., Piskorz, C. F., Alderfer, J. L., Matta, K. L.: Use of 1,2-dichloro 4,5-dicyanoquinone (DDQ) for cleavage of the 2-naphthylmethyl (NAP) group, *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 169–173.
29. Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O.: Specific removal of *o*-methoxybenzyl protection by DDQ oxidation, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982) 885–888.
30. Tatai, J., Fügedi, P.: Synthesis of the putative minimal FGF binding motif heparan sulfate trisaccharides by an orthogonal protecting group strategy, *Tetrahedron* **64** (2008) 9865–9873.
31. Plante, O. J., Buchwald, S. L., Seeberger, P. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 7148–7149.
32. Gigg, R.; Conant, R. *Carbohydr. Res.* **100** (1982) C5–C9.
33. Daragics, K., Fügedi, P.: (2-Nitrophenyl)acetyl: A new, selectively removable hydroxyl protecting group, *Org. Lett.* **12** (2010) 2076–2079.
34. Wong, C. H.; Ye, X. S.; Zhang, Z.: Assembly of oligosaccharide libraries with a designed building block and an efficient orthogonal protection–deprotection strategy, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 7137–7138.
35. Zhu, T., Boons, G.-J.: A new set of orthogonal protecting groups for the oligosaccharide synthesis on a polymeric support, *Tetrahedron: Asymm.* **11** (2000) 199–205.
36. Prabhu, A., Venot, A., Boons, G.-J.: New set of orthogonal protecting groups for the modular synthesis of heparan sulfate fragments, *Org. Lett.*, **5** (2003) 4975–4978.
37. Barresi, F., Hindsgaul, O.: The synthesis of  $\beta$ -mannopyranosides by intramolecular aglycon delivery: scope and limitations of the existing methodology, *Can. J. Chem.* **72** (1994) 1447–1465.
38. a) Crich, D., Sun, S.: Direct formation of  $\beta$ -mannopyranosides and other hindered glycosides from thioglycosides, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 435–436. b) Sun, S., Crich, D. Direct chemical synthesis of  $\beta$ -mannopyranosides and other glycosides via glycosyl triflates, *Tetrahedron* **54** (1998) 8321–8348. c) Crich, D. Smith, M.: Solid-phase synthesis of  $\beta$ -mannosides, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 8867–8869.
39. a) Satoh, H., Hansen, H. S., Manabe, S., van Gunsteren, W. F., Hünenberger, P. H.: Theoretical investigation of solvent effects on glycosylation reactions: stereoselectivity controlled by preferential conformations of the intermediate oxacarbenium-counterion complex, *J. Chem. Theory Comput.* **6** (2010) 1783–1797. b) Kalikanda, J., Li, Z.: Study of the stereoselectivity of 2-azido-2-deoxygalactosyl donors: Remote protecting group effects and temperature dependency, *J. Org. Chem.* **76** (2011) 5207–5218. c) Walvoort, M. T. C., Lodder, G., Overkleeft, H. S., Codée, J. D. C. van der Marel, G. A.: Mannosazide methyl uronate donors. Glycosylating

- properties and use in the construction of  $\beta$ -mannaca-containing oligosaccharides, *J. Org. Chem.*, **75** (2010) 7990–8002. d) Fügedi, P.: The influence of solvents on the stereoselectivity of glycosylations, *OL 128, 16th European Carbohydrate Symposium*, Sorrento, 3-7 July, 2011.
40. Fischer, E.: Ueber die Glucoside der Alkohole, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **26** (1893) 2400 – 2412.
  41. Garcia, B. A., Gin, D. Y.: Dehydrative glycosylation with activated diphenyl sulfonium reagents. Scope, mode of C(1)-hemiacetal activation, and detection of reactive glycosyl intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4269– 4279.
  42. a) Koenigs, W., Knorr, E.: Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34** (1901) 957 – 981. b) Helferich, B., Wedemeyer, K-F.: Zur Darstellung von Glucosiden aus Acetobromoglucose, *Liebigs Ann. Chem.* **563** (1949) 139 – 145. c) Hanessian, S., Banoub, J.: Chemistry of the glycosidic linkage. An efficient synthesis of 1,2-trans disaccharides, *Carbohydr. Res.* **53** (1977) C13 – C16. d) Lemieux, R. U., Hendriks, K. B., Stick, R. V., James, K.: Halide ion catalyzed glycosidation reactions. Synthesis of  $\alpha$ -linked disaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 4056–4062.
  43. Mukaiyama, T., Murai, Y., Shoda, S-I.: An efficient method for glycosylation of hydroxy compounds using glucopyranosyl fluoride, *Chem. Lett.* (1981) 431 – 432.
  44. Yamaguchi, M., Horiguchi, A., Fukuda, A., Minami, T.: Novel synthesis of aryl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1990, 1079–1082.
  45. Schmidt, R. R., Michel, J.: Facile synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -*O*-glycosyl imidates; preparation of glycosides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19** (1980) 731 – 732.
  46. a) Kondo, H., Ichikawa, Y., Wong, Ch-H.:  $\beta$ -Sialyl phosphite and phosphoramidite: synthesis and application to the chemoenzymic synthesis of CMP-sialic acid and sialyl oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 8748– 8750. b) Martin, T. J., Schmidt, R. R.: Efficient sialylation with phosphite as leaving group, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 6123–6126.
  47. Lönn, H., Stenvall, K.: Exceptionally high yield in glycosylation with sialic acid. Synthesis of a GM3 glycoside, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 115– 116.
  48. Hashimoto, S., Honda, T., Ikegami, S.: A rapid and efficient synthesis of 1,2-trans-linked glycosides via benzyl- or benzoyl-protected glucopyranosyl phosphates, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1989) 685–687.
  49. a) Danishefsky, S. J., On the direct epoxidation of glycals: application of a reiterative strategy for the synthesis of  $\beta$ -linked oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 6661–6666. b) Danishefsky, S. J., McClure, K. F., Randolph, J. T., Ruggeri, R. B.: A strategy for the solid-phase synthesis of oligosaccharides, *Science*, **260** (1993) 1307– 1309.
  50. Mootoo, D. R., Konradsson, P., Udodong, U., Fraser-Reid, B.: Armed and disarmed n-pentenyl glycosides in saccharide couplings leading to oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 5583–5584.
  51. Mach, M., Schlueter, U., Mathew, F., Fraser-Reid, B., Hazen, K. C.: Comparing n-pentenyl orthoesters and n-pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors, *Tetrahedron* **58** (2002) 7345–7354.
  52. Kim, K. S., Kim, J. H., Lee, Y. J., Lee, Y. J., Park, J.: 2-(Hydroxycarbonyl)benzyl glycosides: a novel type of glycosyl donors for highly efficient  $\beta$ -mannopyranosylation and oligosaccharide synthesis by latent-active glycosylation, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 8477–8481.



53. Veeneman, G. H., van Leeuwen, S. H., van Boom, J. H.: Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II. An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 1331–1334.
54. Lönn, H.: Synthesis of a tri-saccharide and a hepta-saccharide which contain a-L-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins, *Carbohydr. Res.* **139** (1985) 105–113.
55. a) Andersson, F., Fügedi, P., Garegg, P. J., Nashed, M.: Synthesis of 1,2-cis-linked glycosides using dimethyl(methylthio)sulfonium triflate as promoter and thioglycosides as glycosyl donors, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 3919–3922. b) Codée, J. D. C., Litjens, R. E. J. N., den Heeten, R., Overkleeft, H. S., van Boom, J. H., van der Marel, G. A.: Ph<sub>2</sub>SO/Tf<sub>2</sub>O: a powerful promotor system in chemoselective glycosylations using thioglycosides, *Org. Lett.* **5** (2003) 1519–1522.
56. Kahne, D., Walker, S., Cheng, Y., van Engen, D.: Glycosylation of unreactive substrates, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 6881–6882.
57. a) Boltje, T. J., Buskas, T., Boons, G.-J.: Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research, *Nature Chem.* **1** (2009) 611–622. b) Yu, H., Chen, X.: Carbohydrate post-glycosylational modifications, *Org. Biomol. Chem.* **5** (2007) 865–872. c) Chokhawala, H. A. et al.: Combinatorial chemoenzymatic synthesis and high throughput screening of sialosides. *ACS Chem. Biol.* **3** (2008) 567–576.
58. Waldron, K. W., Faulds, C. B.: Cell wall polysaccharides: composition and structure, *Comprehensive Glycoscience I*, (főszerkesztő: Kamerling, J. P.) Elsevier Science, 2007, 181–201.
59. Csávás Magdolna: Arabinogalaktán oligoszacharid-sorozat szintézise, Doktori értekezés, Debreceni Egyetem, TTK, 2003.
60. Sommer-Knudsen, J., Bacic, A., Clarke, A. E.: Hydroxyproline-rich plant glycoproteins, *Phytochem.* **47** (1998) 483–497.
61. Majewska-Sawka, A., Nothnagel, E. A.: The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development, *Plant Physiol.* **122** (2000) 3–9.
62. Xu, J., Tan, L., Lampion, D. T. A., Showalter, A. M., Kieliszewski, M. J.: The O-Hyp glycosylation code in tobacco and arabidopsis and a proposed role of Hyp-glycans in secretion, *Phytochem.* **69** (2008) 1631–1640.
63. José-Estanyol, M., Puigdoménech, P.: Plant cell wall glycoproteins and their genes, *Plant Physiol. Biochem.* **38** (2000) 97–108.
64. Yamada, H.: Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity, *Carbohydr. Polymers* **251** (1994) 269–276.
65. Wagner, H., Stuppner, H., Schäfer, Zenk, M.: Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, *Phytochemistry*, **27** (1988), 119–126.
66. Knox, J. P.: Molecular probes for the plant cell surface, *Protoplasma* **167** (1992) 1–9.
67. Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell A., Mackie W., Knox J.P.: Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies, *Glycobiology* **6** (1996) 131–139.
68. Steffan, W., Kovác, P., Albersheim, P., Darvill, A. G., Hahn, M. G.: Characterization of a monoclonal antibody that recognizes an arabinosylated (1-6)- $\beta$ -D-galactan epitope in plant complex carbohydrates, *Carbohydr. Res.* **275** (1995) 295–307.
69. Timmers, C. M., Wigchert, S. C. M., Leeuwenburgh, M. A., van der Marel, G. A., van Boom, J. H.: Synthesis of tetrameric arabinogalactans based on 1,2-anhydrosugars, *Eur. J. Org. Chem.* 1998, 91–97.

70. Du, Y., Pan, Q., Kong, F.: Synthesis of a tetrasaccharide representing a minimal epitope of an arabinogalactan, *Carbohydr. Res.* **323** (2000) 28–35.
71. Gu, G., Yang, F., Du, Y., Kong, F.: Synthesis of hexasaccharide that relates to the arabinogalactan epitope, *Carbohydr. Res.* **336** (2001) 99–106.
72. Zeng, Y., Li, A., Kong, F.: A concise synthesis of arabinogalactan with  $\beta$ -(1-6) galactopyranose backbone and  $\alpha$ -(1-2) arabinofuranose side chain, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 8325–8329.
73. Li, A., Kong, F.: Synthesis of arabinogalactans consisting of  $\beta$ -(1-6)-linked D-galactopyranosyl backbone and  $\alpha$ -(1-3)-linked L-arabinofuranosyl side chains, *Carbohydr. Res.* **339** (2004) 1847–1856.
74. Li, A., Kong, F.: Concise syntheses of arabinogalactans with  $\beta$ -(1-6)-linked D-galactopyranosyl backbones and  $\alpha$ -(1-3)- and  $\alpha$ -(1-2)-linked arabinofuranose side chains, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 839–853.
75. Ning, J., Wang, H., Yi, Y.: A simple approach to 3,6-branched galacto-oligosaccharides and its application to the syntheses of a tetrasaccharide and a hexasaccharide related to the arabinogalactans (Ags), *Tetrahedron Lett.* **43** (2002) 7349–7352.
76. Lipták, A., Fügedi, P., Kerékgyártó, J., Nánási, P.: Preparation of mixed-acetal derivatives of carbohydrates by acetal-exchange reactions, *Carbohydr. Res.* **113** (1983) 225–231.
77. Barili, P.L., Berti, G., Catelani, G., Colonna, F., Marra, A.: New results in the isopropylidenation of galactopyranosides. Useful intermediates for the synthesis of galactose derivatives, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 2307–2310.
78. Borbás, A., Jánossy, L., Lipták, A.: Scope and limitation of the application of the (methoxydimethyl)methyl group in the synthesis of 2'-O-, and 2',6'-di-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactoses. *Carbohydr. Res.* **318** (1999) 98–109.
79. Csávás, M., Borbás, A., Jánossy, L., Batta, G., Lipták, A.: Synthesis of the  $\alpha$ -L-Araf-(1-2)- $\beta$ -D-Galp-(1-6)- $\beta$ -D-Galp-(1-6)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1-2)]- $\beta$ -D-Galp-(1-6)-D-Gal hexasaccharide as a possible repeating unit of the cell-cultured exudates of *Echinacea purpurea* arabinogalactan, *Carbohydr. Res.* **336** (2001) 107–115.
80. Csávás, M., Borbás, A., Szilágyi, L., Lipták, A.: Successful combination of (methoxydimethyl)methyl (MIP) and (2-naphthyl)methyl (NAP) ethers for the synthesis of arabinogalactan-type oligosaccharides. *Synlett* (2002) 887–890.
81. Csávás, M., Borbás, A., Jánossy, L., Lipták, A.: Synthesis of an arabinogalactan-type octa- and two isomeric nonasaccharides. Suitable tuning of protecting groups, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 631–635.
82. Lipták, A., Borbás, A., Jánossy, L., Szilágyi, L.: Preparation of (2-naphthyl)-methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 2-naphthylmethyl (NAP) ethers. *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 4949–4953.
83. Borbás, A., Szabó, Z. B., Szilágyi, L., Bényei, A., Lipták, A.: Stereoselective (2-naphthyl)methylation of sugar hydroxyls by the hydrogenolysis of diastereoisomeric dioxolane-type (2-naphthyl)methylene acetals. *Carbohydr. Res.* **337** (2002) 1941–1951.
84. Borbás, A., Szabó, Z. B., Szilágyi, L., Bényei, A., Lipták, A.: Dioxane-type (2-naphthyl)methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 6-O- and 4-O-(2-naphthyl)methyl (NAP) ethers, *Tetrahedron* **58** (2002) 5723–5732.
85. Classen, B., Csávás, M., Borbás, A., Dingermann, T., Zündorf, I.: Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*, *Planta Med.* **70** (2004) 861–865.

86. Fekete, A., Borbás, A., Antus, S., Lipták, A.: Synthesis of 3,6-branched arabinogalactan-type tetra- and hexasaccharides for characterization of monoclonal antibodies, *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 1434–1441.
87. Lipták, A., Jánosy, L., Batta, G., Borbás, A., Szejtli, J.: A new mixed acetal-type substitution pattern for  $\alpha$ -cyclodextrin. Preparation of hexakis(3-O-benzyl)- $\alpha$ -cyclodextrin, *Carbohydr. Lett.* **4** (2001) 111–116.
88. Lipták, A., Jánosy, L., Borbás, A., Szejtli, J.: Mixed acetals of cyclodextrins. Preparation of hexakis-, heptakis- and octakis[2,6-di-O-(methoxydimethyl)methyl]- $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins, *Carbohydr. Res.* **337** (2002) 93–96.
89. Simanek, E. E., McGarvey, G. J., Jablonowski, J. A., Wong, C.-H.: Selectin-carbohydrates interactions: from natural ligands to designed mimics, *Chem. Rev.* **98** (1998) 833–862.
90. Ernst, B., Kolb, H. C., Schwardt, O.: Carbohydrate mimetics in drug discovery, Selectin antagonists, *The organic chemistry of sugars* (szerkesztők: Levy, D. A., Fügedi, P.) CRC Press, 2006, 828–861.
91. Kannagi, R.: Carbohydrate-based treatment of cancer metastasis, *Carbohydrate based drug discovery* (szerkesztő: Wong, C.-H.) Wiley-VCH, 2003, II. kötet, 803–830.
92. a) Springer, T. A.: Adhesion receptors of the immune-system, *Nature*, **346** (1990) 425–434. b) Buerke, M., Weyrich, A. S., Zheng, Z., Gaeta, F. C., Forrest, M. J., Lefer, A. M.: Sialyl Lewis x-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats, *J. Clin. Invest.* **93** (1994) 1140–1148.
93. Welply, J. K., Keene, J. L., Schmukey, J. J., Howard, S. C.: Selectins as potential targets of therapeutic intervention in inflammatory diseases, *Biochim. Biophys. Acta* **1197** (1994) 215–226.
94. a) Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M.: Selectins, *J. Clin. Invest.* **91** (1993) 379–387. b) Rosen, S. D., Bertozzi, C. R.: The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (1994) 663–673. c) Graves, B. J., Crowther, R. L., Chandran, C., Rumberger, J. M., Li, S., Huang, K.-S., Presky, D. H., Familletti, P. C., Wolitzky, B. A., Burns, D. K.: Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains, *Nature* **367** (1994) 532–538.
95. Ehrhardt, C., Kneuer, C., Bakowsky, U.: Selectins – an emerging target for drug delivery, *Advanced Drug Deliv. Rev.* **56** (2004) 527–549.
96. Brandley, B. K., H., Kiso, M., Abbas, S., Nikrad, P., Srivatasava, O., Foxall, C., Oda, Y., Hasegawa, A.: Structure-function studies on selectin carbohydrate ligands. Modifications to fucose, sialic acid and sulphate as a sialic acid replacement, *Glycobiology* **3** (1993) 633–641.
97. Ramphal, J. Y., Zheng, Z.-L., Perez, C., Walker, L. E., DeFrees, S. A., Gaeta, F. C. A.: Structure-activity relationships of sialyl Lewis x-containing oligosaccharides. 1. Effect of modifications of the fucose moiety, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 3459–3463.
98. Rinnbauer, N., Ernst, B., Wagner, B., Magnani, J., Benie, A. J., Peters, T.: Epitope mapping of sialyl Lewisx bound to E-selectin using saturation transfer difference NMR experiments, *Glycobiology* **13** (2003) 435–443.
99. Scheffler K., Ernst, B., Katopodis, A., Magnani, J. L., Wang, W. T., Weisemann, R., Peters, T.: Determination of the bioactive conformation of the carbohydrate ligand in the E-selectin/sialyl Lewisx complex, *Angew. Chem. Int. Ed.* **34** (1995) 1841–1844.
100. Scheffler K., Brisson, J.-R., Weisemann, R., Magnani, J. L., Wang, W. T., Ernst, B., R., Peters, T.: Application of homonuclear 3D and pseudo-3D NMR experiments to elucidate fine details in 2D-trNOESY spectra of sialyl Lewis<sup>x</sup> bound to E-selectin, *Biomol. NMR* **9** (1997) 423–436.

101. Poppe, L., Brown, G. S., Philo, J. S., Nikrad, P. V., Shah, B. H.: Conformation of sLe<sup>x</sup> tetrasaccharide, free in solution and bound to to E-, P- and L-selectin, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 1727–1736.
102. Harris, R., Kiddle, G. R., Field, R. A., Milton, M., J., Ernst, B., Magnani, J. L., Homans, S. W.: Stable-isotope-assisted NMR studies on <sup>13</sup>C-enriched sialyl Lewis<sup>x</sup> in solution and bound to E-selectin, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 2546–2551.
103. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D., Camphausen, R. T.: Insight into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to sLe<sup>x</sup> and PSGL-1, *Cell* **103** (2000) 467–479.
104. Kameyama, A., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A.: Total synthesis of sialyl Lewis X, *Carbohydr. Res.* **209** (1991) C1–C4.
105. Nicolaou, K. C., Hummel, C. W., Bockovich, N. J., Wong, C.-H.: Stereocontrolled synthesis of sialyl Lex, the oligosaccharide binding ligand to ELAM-1, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1991, 870–872.
106. Danishefsky, S. J., Gervay, J., Peterson, J. M., McDonald, F. E., Koseki, K., Griffith, D. A., Oriyama, T., Marsden, S. P.: Application of glycals to the synthesis of oligosaccharides: convergent total syntheses of the Lewis X trisaccharide sialyl Lewis X antigenic determinant and higher congeners, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 1940–1953.
107. Huang, K.-T., Wu, B.-C., Lin, C.-C., Luo, S.-C., Chen, C., Wong, C.-H., Lin, C.-C.: Multi-enzyme one-pot strategy for the synthesis of sialyl Lewis X-containing PSGL-1 glycopeptide, *Carbohydr. Res.* **341** (2006) 2151–2155.
108. Ohmoto, H., Nakamura, K., Inoue, T., Kondo, N., Inoue, Y., Kondo, H., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A.: Studies on selectin blocker. 1. structure–activity relationships of sialyl Lewis X analogs, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 1339–1343.
109. Manning, D. D., Bertozzi, C. R., Rosen, S. D., Kiessling, L. L.: Tin-mediated phosphorylation: Synthesis and selectin binding of a phospho Lewis A analog, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 1953–1956.
110. Thoma, G., Schwarzenbach, F., Duthaler, R. O.: Synthesis of sialyl Lewis X mimic with carboxylic acid group: chemical approach toward the elucidation of the bioactive conformation of sialyl Lewis X, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 514–524.
111. Bamford, M. J., Bird, M., Gore, P. M., Holmes, D. S., Priest, R., Prodger, J. C., Saez, V.: Synthesis and biological activity of conformationally constrained sialyl Lewis X analogues with reduced carbohydrate character, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6** (1996) 239–244.
112. Uchiyama, T., Vassilev, V. P., Kajimoto, T., Wong, W., Huang, H., Lin, C. C., Wong, C.-H.: Design and synthesis of sialyl Lewis X mimetics, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5395–5396.
113. Banteli, R., Ernst, B.: Synthesis of sialyl LewisX mimics: Replacement of galactose by aromatic spacers, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 4059–4062.
114. Thoma, G., Magnani, J. L., Patton, J. T., Ernst, B., Jahnke, W.: Preorganization of the bioactive conformation of sialyl Lewis X analogues correlates with their affinity to E-selectin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 1941–1945.
115. Marron, T. J., Woltering, T. J., Weitz-Schmidt, G., Wong, C.-H.: C-Mannose derivatives as potent mimics of sialyl Lewis X, *Tetrahedron Lett.* **38** (1996) 9037–9040.
116. Wong, C.-H., Moris-Varas, F., Hung, S. C., Marron, T. G., Lin, C. C., Gong, K. W., Weitz-Schmidt G.: Small molecules as structural and functional mimics of sialyl Lewis X tetrasaccharide in selectin inhibition: A remarkable enhancement of

- inhibition by additional negative charge and/or hydrophobic group, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 8152–8158.
117. Pedatella, S., De Nisco, M., Ernst, B., Guaragna, A., Wagner, B., Woods, R. J., Palumbo, G.: New sialyl Lewis<sup>x</sup> mimic containing a  $\beta$ 3-amino acid spacer, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 31–38.
  118. Tsai, C.-Y., Huang, X., Wong, C.-H.: Design and synthesis of cyclic sialyl Lewis<sup>x</sup> mimetics: a remarkable enhancement of inhibition by pre-organizing all essential functional groups, *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 9499–9503.
  119. Kogan, T. P., Dupré, B., Bui, H., McAbee, K. L., Kassir, J. M., Scott, I. L., Hu, X., Vanderslice, P., Beck, P. J., Dixon R. A. F.: Novel synthetic inhibitors of selectin-mediated cell adhesion: Synthesis of 1,6-bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC1269), *J. Med. Chem.* **41** (1998) 1099–1111.
  120. Davenpeck, K. L., Berens, K. L., Dixon, R. A. F., Dupré, B., Bochner, B. S.: Inhibition of adhesion of human neutrophils and eosinophils to P-selectin by the sialyl Lewis x antagonist TBC1269: Preferential activity against neutrophil adhesion in vitro, *J. Allergy Clin. Immun.* **105** (2000) 769–775.
  121. Girard, C., Dourlat, J., Savarin, A., Surcin, C., Leue, S., Escriou, V., Largeau, C. Herscovici, J., Scherman, D.: Sialyl Lewis x analogs based on a quinic acid scaffold as the fucose mimic, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 3224–3228.
  122. Hayashi, M., Tanaka, M., Itoh, M., Miyauchi, H.: A convenient and efficient synthesis of sLeX analogs, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 2938–2945.
  123. Nelson, R. M., Dolich, S., Aruffo, A., Cecconi, O., Bevilacqua, M. P. J.: Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin, *J. Clin. Invest.* **91** (1993) 1157–1166.
  124. a) Chabre, Y. M., Roy, R.: Recent trends in glycodendrimer syntheses and applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **8** (2008) 1237–1285. b) Pieters, R. J.: Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Org. Biomol. Chem.* **7** (2009) 2013–2025. c) Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E., Strong, L. E.: Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 2348–2368. d) Mammen, M., Choi, S. K., Whitesides, G. M.: Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37** (1998) 2755–2794.
  125. Brocke, C., Kunz, H.: Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens, *Bioorg. Med. Chem.* **10** (2002) 3085–3112.
  126. Furuike, T., Sadamoto, R., Niihara, K., Monde, K., Sakairi N., Nishimura, S.-I.: Chemical and enzymatic synthesis of glycocluster having seven sialyl lewis X arrays using  $\beta$ -cyclodextrin as a key scaffold material, *Tetrahedron* **61** (2005) 1737–1742.
  127. Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Herczegh, P., Agócs, A., Lipták, A.: Sulfonmethyl analogues of aldose-2-ulonic acids. Synthesis of a new sialyl Lewis X analogue, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3639–3642.
  128. Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Fehér, K., Csávás, M., Szilágyi, L., Herczegh, P., Lipták, A.: Sulfonic acid analogues of the sialyl Lewis X tetrasaccharide, *Tetrahedron: Asymmetry*. **11** (2000) 549–566.
  129. Borbás, A., Csávás, M., Szilágyi, L., Májer, G., Lipták, A.: Replacement of carbohydrate sulfates by sugar C-sulfonic acid derivatives, *J. Carbohydr. Chem.* **23** (2004) 133–146.
  130. Májer, G., Borbás, A., Illyés, T.-Z., Szilágyi, L., Bényei, A., Lipták, A.: Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration on the basis of the three-bond carbon-proton couplings, *Carbohydr. Res.* **342** (2007) 1393–1404.

131. Lipták, A., Borbás A.: Cukor C-szulfonsavak és –metilén-szulfonsavak szintézise, *Magy. Kém. Foly.* **109-110** (2004) 60–63.
132. Májer Gábor: Anionos oligoszacharidok szintézise 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil építőelemek felhasználásával. Ketopiranozil glikozidok anomer konfigurációjának vizsgálata. PhD értekezés, Debreceni Egyetem, Kémia Doktori Iskola, 2008.
133. Szabó, Z. B., Borbás, A., Bajza, I., Lipták, A., Antus, S.: First synthesis of sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic acid, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 1196–1198.
134. Csávás, M., Májer, G., Herczeg, M., Remenyik, J., Lázár L., Mándi, A., Borbás, A., Antus, S.: Investigation of glycosylating properties of 1-deoxy-1-ethoxysulfonyl-hept-2-ulopyranosyl derivatives. Synthesis of a new sulfonic acid mimetic of the sialyl Lewis X tetrasaccharide, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 1527–1534.
135. Koenig, A., Jain, R., Vig, R., Norgard-Sumnicht, K. E., Matta, K. L., Varki, A.: Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1, *Glycobiology*, **7** (1997) 79–93.
136. a) Miyano, M., Benson, A. A.: The plant sulfolipid. VII. Synthesis of 6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1')-glycerol and radiochemical syntheses of sulfolipids, *J. Am. Chem. Soc.* **84** (1962) 59-62. b) Lehmann, J., Weckerle, W.: Zuckersulfonsäuren. Teil I. Möglichkeiten der Konformationsanalyse durch  $^{35}\text{S}$ -Bisulfitaddition an Hex-5-enopyranoside, *Carbohydr. Res.* **22** (1972) 23–35. c) Reistad, R.: 2-Amino-2,6-dideoxyhexose-6-sulfonic acid- constituent of cell-wall of halococcus-sp., strain 24, *Carbohydr. Res.* **54** (1977) 308–310. d) Gigg, R., Penglis, A. A. E., Conant, R. J.: Synthesis of 3-*O*-(6-deoxy-6-sulpho- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-1,2-di-*O*-hexadecanoyl-L-glycerol, 'sulpho-quinovosyl diglyceride, *Chem. Soc., Perkin Trans 1* (1980) 2490-2493. e) Hoch, M., Heinz, E., Schmidt, R. R. Synthesis of 6-deoxy-6-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl phosphate; *Carbohydr. Res.* **191** (1989) 21–28. f) Fernandez-Bolanos, J., Castiilo, I. M., Fernandez-Bolanos Guzman J.: Synthesis of 2-Amino-2,6-dideoxy-D-glucopyranose-6-sulphonic Acid; *Carbohydr. Res.* **147** (1986) 325–329. g) Huang, J., Widlanski, T. S.: Facile synthesis of sulfonyl chlorides, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 2657–2660.
137. a) Dess, D. B.; Martin J. C.: Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 4155–4156.
138. Hori, H., Nakajima, T., Nishida, Y., Ohru, H., Meguro, H.: A simple method to determine the anomeric configuration of sialic acid and its derivatives by  $^{13}\text{C}$ -NMR, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 6317–6322.
139. Hansen, P. E.: Carbon-hydrogen spin-spin coupling constants, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **14** (1981) 175–296.
140. Thomas, W. A.: Unraveling molecular structure and conformation-the modern role of coupling constants, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **30** (1997) 183–207.
141. a) Unger F. M. The chemistry and biological significance of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic-acid, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **38** (1981) 323-388. b) Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y.: A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN) its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein in rainbow trout eggs, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 1550-11557. c) Paulson J. C., Rogers G. N., Carrell, S. M., Higa, H. H., Pritelett T., Milks, G., Sabesan S.: Selection of influenza-virus variants based on sialooligosaccharide receptor specificity, *Pure Appl. Chem.* **56** (1984) 797-805.

142. Tsukida, T., Yoshida, M., Kurokawa, K., Nakai, Y., Achiha, T., Kiyoi, T., Kondo, H.: A highly practical synthesis of sulfated Lewis X: one-pot, two-step glycosylation using “armed/disarmed” coupling and selective benzylation and sulfation, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 6876–6881.
143. Aydin, R., Günther, H.:  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  Spin-spin coupling. X - Norbornane: a reinvestigation of the Karplus curve for  $^3J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ , *Magn. Reson. Chem.* **28** (1990) 448–457.
144. a) Haverkamp, J., Spoormaker, T., Dorland, L., Vliegthart J. F. G., Schauer, R.: Determination of the  $\beta$ -anomeric configuration of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy; *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 4851–4853. b) Prytulla, S., Lauterwein, J., Klessinger, M., Thiem J.: Configurational assignment of N-acetylneuraminic acid and analogues *via* the vicinal C,H coupling constants; *Carbohydr. Res.* **215** (1991) 345–349. c) Unger F. M., Stix, D, Schulz, G.: The anomeric configurations of the two ammonium(methyl 3-deoxy-D-manno-2-octulopyranosid)onate salts (methyl  $\alpha$ - and  $\beta$ -ketopyranosides of KDO), *Carbohydr. Res.* **80** (1980) 191–195. d) Kohlbrenner W. E., Fesik S. W.: Determination of the anomeric specificity of the *Escherichia coli* CTP: CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase by  $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy; *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 14695–14699. e) Norbeck D. W., Kramer J. B., Lartey P. A.: Synthesis of an isosteric phosphonate analog of cytidine 5'-monophospho-3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid; *J. Org. Chem.* **52** (1987) 2174–2179.
145. Czifrák K., Kovács L., Kövér K. E., Somsák L.: Synthesis of some derivatives of C-(1-deoxy-1-N-substituted-D-glucopyranosyl)formic acid (D-gluco-hept-2-ulopyranosonic acid) as potential inhibitors of glycogen phosphorylase, *Carbohydr. Res.* **340** (2005) 2328–2334.
146. a) Schlesselmann P., Fritz H., Lehmann J., Uchiyama T., Brewer C. F., Hehre J. E. Factors determining steric course of enzymic glycosylation reactions: glycosyl transfer products formed from 2,6-anhydro-1-deoxy-D-gluco-hept-1-enitol by  $\alpha$ -glucosidases and an inverting exo- $\alpha$ -glucanase, *Biochemistry*, **21** (1982) 6606–6614. b) Li X., Takahashi H., Ohtake H., Shiro M., Ikegami S.: Stereoselective synthesis and structure elucidation of spiro-ketodisaccharides, *Tetrahedron*, **57** (2001) 8053–8066.
147. a) Varki, A.: Glycan-based interactions involving vertebrate sialic acid recognizing proteins, *Nature*, **446** (2007) 1023–1029) 2328–2334. b) Kiefel, M. J., von Itzstein, M.: Recent advances in the synthesis of sialic acid derivatives and sialylmimetics as biological probes, *Chem. Rev.* **102** (2002) 471–490.
148. Fernandes-Mayoralas, A.; Marra, A., Trumtel, M., Veyrières, A., Sinaÿ, P.: Preparation of pyranoid glycal derivatives from phenyl thioglycosides and glycosyl phenyl sulphones, *Carbohydr. Res.* **188** (1989) 81–95.
149. Rollin, P.; Sinaÿ, P.: A convenient, one-step oxidation of glycals to lactones using pyridinium chlorochromate, *Carbohydr. Res.* **98** (1981) 139–142.
150. Rakotomanomana, N., Lacombe, J.-M., Pavia, A. A.: Selective reduction-acetylation of azido-sugars with thioacetic acid-potassium thioacetate, *Carbohydr. Res.* **197** (1990) 318–323.
151. Marshall, B.J., Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*, **323** (1984) 1311–1315.
152. Karlsson, K.-A.: Glycobiology of *Helicobacter pylori* and gastric disease. *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Part II: Biology of Saccharides. Vol. 4 (szerk.: Ernst, B., Hart, G. W., Sinaÿ, P.) Wiley-VCH; Weinheim, 2000, 965–976.
153. a) Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A., Zopf, D.: Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing

- oligosaccharides. *Infect. Immun.* **65** (1997) 750–757. b) Ascencio, F., Fransson, L.-Å., Wadström, T.: Affinity of gastric pathogen *Helicobacter pylori* for N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate, *J. Med. Microbiol.* **38** (1993) 240–244. c) Ångström, J., Teneberg, S., Abul Milh, M., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B.-M.; Ölwegård Halvarsson, M., Danielsson, D., Näslund, I., Ljungh, Å., Wadström, T., Karlsson, K.-A.: The lactosylceramide binding specificity of *Helicobacter pylori*, *Glycobiology* **8** (1998) 297–309.
154. Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergström, J., Boren, T., Danielsson, D., Teneberg, S.: The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 15390–15397.
155. Norton, C., J., Seppi, N. F., Reuter, M. J.: Alkanesulfonate synthesis I. Ion catalysis of sulfite radical-ion addition to olefins, *J. Org. Chem.* **33** (1968) 4158–4159. Norton, N. F. S., Reuter M. J., *J. Org. Chem.* **33** (1968) 4158–4165.
156. Lehmann, J., Weckerle, W.: Zuckersulfosäuren. Teil I. Möglichkeiten der Konformationsanalyse durch 35S-Bisulfitaddition an Hex-5-enopyranoside, *Carbohydr. Res.* **22** (1972) 23–35.
157. Yoshikawa, M., Yamaguchi, S., Matsuda, H., Tanaka, N., Yamahara, J., Murakami, N.: Crude drugs from aquatic plants. V. On the constituents of *Alismatis rhizoma*. (3). Stereostructures of water-soluble bioactive sesquiterpenes, sulfoorientalols a, b, c, and d, from Chinese *Alismatis rhizoma*, *Chem. Pharm. Bull.* **42** (1994) 2430–2435.
158. Islam, T.; Linhardt, R. J.: Chemistry, biochemistry and pharmaceutical potentials of glycosaminoglycans and related saccharides, *Carbohydrate based drug discovery* (szerk.: Wong, C-H.) Wiley-VCH, 2003, Vol. II. 407–459.
159. Capila, I., Linhardt, R. J.: Heparin-protein interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 390–412.
160. Casu, B., Lindahl, U.: Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **57** (2002) 159–206.
161. Fügedi, P.: The potential of the molecular diversity of heparin and heparan sulfate for drug development, *Mini Rev. Med. Chem.* **3** (2003) 659–667.
162. Rosenberg, R. D., Damus, P. S.: *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 6490–6505.
163. a) Sinaÿ, P., Jacquinet, J.-C., Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J., Torri, G.: Total synthesis of a heparin pentasaccharide fragment having high affinity for antithrombin III, *Carbohydr. Res.* **132** (1984) C5–C9. b) Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J., Sinaÿ, P., Jacquinet, J.-C., Torri, G.: Synthesis of heparin fragments, *Carbohydr. Res.* **147** (1986) 221–236.
164. Petitou, M., van Boeckel, C. A. A.: A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 3118–3133.
165. Petitou, M., Herbert, J.-M.: A new generation of antithrombotics based on synthetic oligosaccharides (könyvfejezet), *Carbohydrate based drug discovery* (szerkesztő: Wong, C-H.) Wiley-VCH, 2003, II. kötet, 803–830.
166. Cheng, J. M. W.: Fondaparinux: A new antithrombotic agent, *Clin. Therapeutics* **24** (2002) 1757–1769.
167. van Boeckel, C. A. A., Petitou, M.: The Unique Antithrombin-III Binding Domain of Heparin - a Lead to New Synthetic Antithrombotics, *Angew. Chem. Int. Ed.* **32** (1993) 1671–1690.
168. a) Westerduin, P., van Boeckel, C. A. A., Basten, J. E. M., Broekhoven, M. A., Lucas, H., Rood, A., van der Heijden, H., van Amsterdam, R. G. M., van Dinther, T. G., Meuleman, D. A. G., Visser, A., Vogel, G. M. T., Damm, J. B. L., Overklist, G. T.:



- Feasible synthesis and biological properties of six ‘non-glycosamino’ glycan analogues of the antithrombin III binding heparin pentasaccharide, *Bioorg. Med. Chem.* **2** (1994) 1267–1280. b) Chen, Ch., Yu, B.: Efficient synthesis of Idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 3875–3879.
169. a) Gómez-Outes, A.; Lecumberri, R.; Pozo, C.; Rocha, E.: New anticoagulants: Focus on venous thromboembolism, *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7** (2009) 309–329. b) Harenberg, J.: Development of idraparinix and idrabiotaparinix for anticoagulant therapy, *Thromb. Haemost.* **102** (2009) 811–815.
170. Herczeg, M., Lázár, L., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Toward synthesis of the isosteric sulfonate analogues of the AT-III binding domain of heparin, *Org. Lett.* **11** (2009) 2619–2622.
171. Herczeg, M., Lázár, L., Mándi, A., Komáromi, I., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of disaccharide analogues of the AT-III binding domain of heparin by systematic replacement of sulfate esters with sulfonatomethyl moieties, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 1827–1836.
172. Lázár, L., Herczeg, M., Fekete, A.; Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of sulfonic acid analogues of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin-binding domain of heparin, *Tetrahedron Lett.* **51** (2010) 6711–6714.
173. Lázár, L., Mező, E., Herczeg, M., Lipták, A., Antus, S., Borbás, A.: Synthesis of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin-binding domain of heparin and its bioisosteric sulfonic acid analogues, *Tetrahedron*, közlésre benyújtva
174. Borbás, A., Herczeg, M., Lázár, L., Lipták, A., Antus, S.: First sulfonic acid analogue of Idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide, *EFMC-ISMIC 2010, XXst International Symposium on Medicinal Chemistry*, Brüsszel, Belgium, szept. 5-9, 2010, P292
175. Herczeg, M., Lázár, L., Bereczky, Zs., Kövér, K. E., Timári, I., Kappelmayer, J., Lipták, A., Antus, S. Borbás, A.: Synthesis and anticoagulant activity of bioisosteric sulfonic acid analogues of the antithrombin-binding pentasaccharide domain of heparin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, közlésre benyújtva
176. Herczeg Mihály: Az antitrombotikus hatású idraparinix pentaszacharid új szintézise, valamint két szulfonsav analógiának előállítása, PhD értekezés, Debreceni Egyetem, Természettudományi Doktori Tanács, Kémia Doktori Iskola, 2011.
177. a) Berkowitz, D. B., Maiti, G., Charett, B. D., Dreis, C. D., Macdonald, R. D.: Mono- and bivalent ligands bearing mannose 6-phosphate (M6P) surrogates: targeting the M6P/insulin-like growth factor II receptor, *Org. Lett.* **6** (2004) 4921–4924. b) Jeanjean, A., Gary-Bobo, M., Nirdé, P., Leiris, S., Garcia, M., Morère, A.: Synthesis of new sulfonate and phosphonate derivatives for cation-independent mannose 6-phosphate receptor targeting, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 6240–6243.
178. van den Bos, L. J., Codée, J. D. C., Litjens, R. E. J. N., Dinkelaar, J., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A.: Uronic acids in oligosaccharide synthesis, *Eur. J. Org. Chem.* (2007) 3963–3976.
179. a) Jaquinet, J.-C., Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J., Torri, G., Sinay, P.: Synthesis of heparin fragments. A chemical synthesis of the trisaccharide O-(2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- $\alpha$ -image-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-O-sulfo- $\alpha$ -image-idopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-image-glucopyranose heptasodium salt, *Carbohydr. Res.* **130** (1984) 224–241. b) van Boeckel, C. A. A., Beetz, T., Vos, J. N.; Dejong, A. J. M., van Aelst, S. F., van den Bosch, R. H., Mertens, J. M. R., van der Vlugt, F. A.: Synthesis of a Pentasaccharide Corresponding to the Antithrombin-III Binding Fragment of Heparin, *J. Carbohydr. Chem.* **4** (1985) 293–321. c) Tabeur, C., Machetto, F., Mallet, J.-M., Duchaussoy, P.

- Petitou, M., Sinay, P.: L-Iduronic acid derivatives as glycosyl donors, *Carbohydr. Res.* **281** (1996) 253–275. d) Adinolfi, A., Barone, G., DeLorenzo, F., Iadonisi, A.: A new route to L-iduronate building blocks for the synthesis of heparin-like oligosaccharides, *Synlett* **1999**, 1316–1318. e) Lubineau, A., Gavard, O., Alais, J., Bonnaffé, D.: New accesses to L-iduronyl synthons, *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 307–311. f) Dilhas, A.; Bonnaffé, D.: Efficient selective preparation of methyl-1,2,4-tri-O-acetyl-3-O-benzyl- $\beta$ -L-idopyranuronate from methyl 3-O-benzyl-L-iduronate, *Carbohydr. Res.* **338** (2003) 681–686. g) Kuzmann, J., Medgyes, G., Boros, S.: Synthesis of 2,5-anhydro-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)- and  $\alpha$ -L-idopyranosyluronate-D-mannitol hexa-O-sulfonate hept sodium salt, *Carbohydr. Res.* **339** (2004) 1569–1579. h) Tatai, J.; Osztrovszky, G., Kajtár-Peredy, M., Fügedi, P.: An efficient synthesis of L-idose and L-iduronic acid thioglycosides and their use for the synthesis of heparin oligosaccharides, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 596–606. i) Hansen, S. U., Baráth, M., Salameh, B. A. B., Pritchard, R. G., Stimpson, W. T., Gardiner, J. M., Jayson, G. C.: Scalable synthesis of L-iduronic acid derivatives via stereocontrolled cyanohydrin reaction for synthesis of heparin-related disaccharides, *Org. Lett.* **11** (2009) 4528–4531. j) Saito, A., Wakao, M., Deguchi, H., Mawatari, A., Sobel, M., Suda, Y.: Toward the assembly of heparin and heparan sulfate oligosaccharide libraries: efficient synthesis of uronic acid and disaccharide building blocks, *Tetrahedron*, **66** (2010) 3951–3962.
180. Davis, N. J., Flitsch, S. L.: Selective oxidation of monosaccharide derivatives to uronic acids, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 1181–1184.
181. Nakata, T., Nagao, S., Mori, N., Oishi, T.: Total synthesis of (+)-pederin. 1. Stereocontrolled synthesis of (+)-benzoylpedamide, *Tetrahedron Lett.* **26** (1985) 6461–6464.
182. van den Bos, L. J., Codée, J. D. C., van der Toorn, J. C., Boltje, T. J., van Boom, J. H., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A.: Thioglycuronides: Synthesis and Application in the Assembly of Acidic Oligosaccharides, *Org. Lett.* **6** (2004) 2165–2168.
183. Musicki, B., Widlanski, T. S.: Synthesis of nucleoside sulfonates and sulfones, *Tetrahedron Lett.* **32** (1991) 1267–1270.
184. Hricovini, M., Guerrini, M., Bisio, A., Torri, G., Petitou, M., Casu, B.: Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III, *Biochem. J.* **359** (2001) 265–272.
185. a) Sakairi, N., Basten, J. E. M., van der Marel, G. A., van Boeckel, C. A. A., van Boom, J. H.: Synthesis of a conformationally constrained heparin-like pentasaccharide, *Chem.-Eur. J.* **2** (1996) 1007–1013. b) Das, S. K., Mallet, J. M., Esnault, J., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Sizun, P., Herault, J. P., Herbert, J. M., Petitou, M., Sinay, P.: Synthesis of conformationally locked L-iduronic acid derivatives: Direct evidence for a critical role of the skew-boat S-2(O) conformer in the activation of antithrombin by heparin, *Chem.-Eur. J.* **7** (2001) 4821–4834. c) Das, S. K., Mallet, J. M., Esnault, J., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Sizun, P., Herault, J. P., Herbert, J. M., Petitou, M., Sinay, P.: Synthesis of conformationally locked carbohydrates: A skew-boat conformation of L-iduronic acid governs the antithrombotic activity of heparin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 1670–1673.
186. Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Casu, B.; Torri, G.; Bossennec, V.; Perly, B.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J., Conformer Populations of L-Iduronic Acid Residues in Glycosaminoglycan Sequences, *Carbohydr. Res.* **195** (1990) 157–167.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Lipták András professzor úrnak, hogy elindított a kutatói pályán, és PhD témavezetőként majd kutatócsoportvezetőként irányította munkámat. A kutatómunka iránti lelkesedése, elhivatottsága és alázata példaértékű számomra. El nem múló hálát érzek bizalmáért és szeretetteljes támogatásáért.

Kiemelt köszönettel tartozom Antus Sándor professzor úrnak, az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport vezetőjének, amiért folyamatosan figyelemmel kísérte, és hasznos tanácsaival segítette kutatómunkámat és szakmai előrehaladásomat.

Az értekezésben összefoglalt tudományos eredmények a Biokémiai Tanszéken és az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportnál dolgozó munkatársaim közreműködése nélkül nem jöhettek volna létre. Köszönöm volt kollégáim, dr. Antal Zsuzsa, dr. Bajza István, dr. Farkas Erzsébet, Gálné dr. Remenyik Judit, dr. Gyémánt Gyöngyi, dr. Hajkó János, dr. Jakab Zsolt, dr. Kandra Lili, dr. Kerékgyártó János, dr. Kiss László, Madarasiné Molnár Katalin, dr. Májer Gábor, prof. Nánási Pál, Ráczné Gulyás Márta, dr. Sajtos Ferenc, dr. Szabovik Gabriella, dr. Szurmai Zoltán, Tótiné Dienes Veronika és dr. Varga Zsolt segítségét és barátságát. Különösen hálás vagyok közvetlen munkatársaimnak, dr. Csávás Magdolnának, dr. Fekete Anikónak, Jánossy Lórántnak, Kovácsné Tóth Emesének, dr. Lázár Lászlónak, dr. Herczeg Mihálynak, dr. Mándi Attilának, és Varga Mariannak kitartásukért, lelkes és odaadó munkájukért és barátságukért.

Köszönöm minden társszerzőm értékes szakmai hozzájárulását és segítségét.